博士論文

神経障害性疼痛における
ミクログリア特異的転写因子 MafB の役割

平成 24 年 3 月

九州大学大学院薬学府　医療薬科学専攻

薬理学分野

増田　潤哉

指導教員　　井上　和秀　教授

目次

序論 ..... - 1 -

1-1　実験材料および試薬調製法 ..... - 7 -
1-2　神経障害性疼痛病態モデルマウス作製法 ..... - 9 -
1-3　痛み行動測定法および軽度機械刺激に対する痛み閾値算出法 ..... - 10 -
1-4　脊髄腔内カテーテル留置手術法 ..... - 10 -
1-5　初代培養ミクログリアの調製法および培養法 ..... - 11 -
1-6　薬物処置法 ..... - 12 -
1-7　免疫組織染色法 ..... - 14 -
1-8　免疫細胞染色法 ..... - 15 -
1-9　定量的リアルタイム RT-PCR 法 ..... - 15 -
1-10　生細胞数測定法 ..... - 18 -
1-11　統計処理 ..... - 18 -

2.　実験結果 ..... - 19 -
2-1　神経障害性疼痛モデルマウスの L4 脊髄における MafB の発現量変化 ..... - 19 -
2-2　末梢神経損傷後の脊髄後角における MafB 発現細胞腫の特定 ..... - 20 -
2-3　末梢神経損傷後の脊髄後角ミクログリアでの経時的 MafB 発現変化 ..... - 21 -
2-4　末梢神経損傷後の脊髄後角における MafB 陽性ミクログリアの増殖活性 ..... - 23 -
2-5　末梢神経損傷後の脊髄後角における MafB 陽性ミクログリアの活性化表現型 ..... - 24 -
2-6　MafB 標的 siRNA 処置によるミクログリア細胞での遺伝子発現変化 ..... - 25 -
2-7　MafB 標的 shRNA 発現ウイルス処置によるミクログリア細胞での遺伝子発現変化 - 27 -
2-8　MafB ノックダウンミクログリア細胞の LPS 応答性変化 ..... - 28 -
2-9　MafB ノックダウンミクログリア細胞の細胞増殖能変化 ..... - 29 -
2-10　MafB 標的 siRNA 投与による神経損傷後のアロディニア行動変化 ..... - 30 -
2-11　MafB 標的 siRNA 投与による神経損傷後の脊髄内遺伝子発現変化 ..... - 32 -
2-12　MafB 標的 siRNA 投与による神経損傷後の脊髄後角ミクログリア細胞数変化 ..... - 33 -
2-13　P2X4 受容体欠損マウスにおける神経損傷後の脊髄内 MafB 発現変化 ..... - 34 -
2-14　CCL21 処置によるミクログリア細胞での MafB 発現変化 ..... - 35 -
2-15　CCL21 投与による脊髄後角ミクログリアでの MafB 発現変化 ..... - 36 -
2-16　CCL21 欠損マウスにおける神経損傷後の脊髄内 MafB 発現変化 ..... - 37 -

3.　考察 ..... - 39 -
3-1　神経障害性疼痛モデルにおける MafB の発現解析 ..... - 39 -
3-2　MafB によるミクログリアの機能制御 ..... - 40 -
3-3　アロディニア行動に対する MafB の寄与 ..... - 42 -

3-4　末梢神経損傷によるミクログリアでの MafB 発現誘導.....- 43 -

総括..... - 45 -

引用文献..... - 49 -

謝辞..... - 57 -

序論

痛みとは「組織の実質的あるいは潜在的な損傷に伴われるか、あるいはそのような損傷を表現する言葉で表わされる不快な感覚、情動体験である」と定義されている（国際疼痛学会、2008）。つまり、従来考えられていた「痛い」という単なる感覚的な体験ではなく、痛みに伴って生じる「辛い、苦しい」といった情動的な体験を含んだ複合的なものが痛みの本質であるとされ、さまざまな変動因子が相互に影響し合い、複雑な臨床像を形成している。「痛い」という感覚は本来、侵害刺激に対する生体警告系として必要不可欠な機能を果たしているため、生体にとって必須の感覚であることには違いない。実際にその警告系が欠落している無痛症は、痛みを感じないために自らの身の危険に気付くことができず、時に致死的である。しかしながら、そのような本来の警告系としての役割を持たない病的な痛みは、我々にとって不必要であるのみならず、有害な存在となり、痛みの悪循環、精神的苦痛の発現など QOL の著しい低下に結びつく。したがって、このような病的な痛みを罹患した場合、身体的苦痛ならびに精神的苦痛を適切に緩和するペインコントロールが必要となる。

痛みの種類は、痛みの警告系として機能する、侵害受容器を介した侵害受容性疼痛、神経系の機能異常や障害に由来する神経障害性疼痛、解剖学的な所見がなく、心情と密接に関係する心因性疼痛に大別される。さらに、痛みの継続の有無による急性痛と慢性痛といった分類や、痛みの発生部位による分類などその種類は多種多様に及ぶ。一般的な痛みである侵害受容性疼痛は、警告としての役割を終えることや、適切な治療を受けることで一過性に緩解する急性痛である。一方、神経障害性疼痛は帯状疱疹、糖尿病、外科的手術、癌浸潤などの疾病に伴って認められる慢性痛である。刺激非依存性の自発痛、軽度な痛み刺激に対する感受性が著しく高まる痛覚過敏、本来痛みを誘発しない軽度触刺激を激烈な痛みとして誤認識してしまうアロディニア（Figure 1）といった痛覚伝達異常を主症状とし、既存のあらゆる鎮痛薬が十分に奏効しない難治性疼痛として位置づけられ、臨床上大きな問題となっている(Woolf and Mannion, 1999; Baron, 2006; Nicholson, 2006)。しかしながら、その発症メカニズムは依然として未解明であり、有効な疼痛緩和治療法も確立されていないのが現状である。現在、多くの人々の苦痛を緩和し、QOL を向上させるためにも神経障害性疼痛のメカニズム解明と治療薬開発が急務の課題となっている。

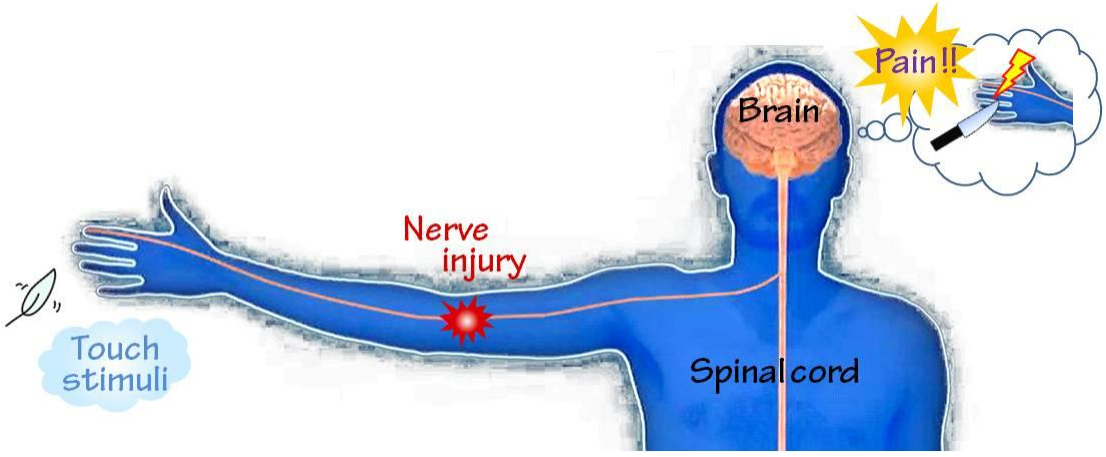


Figure 1. 神経損傷による痛覚伝達異常症状（アロディニア）

痛み刺激は、知覚神経の自由終末に存在する侵害受容器によって受容され、末梢の一次求心性 C 線維または Aδ 線維を介して脊髄後角へ伝達される。脊髄に入力された知覚情報は、二次ニューロンを介して上位中枢神経へと伝えられ、最終的に大脳皮質において痛みとして認識される(Kuner, 2010)。これら痛覚伝達経路のうち、脊髄後角は一次求心性神経からの情報が最初に入力される場であり、末梢神経の損傷に伴う多様な変化が引き起こされる。1965 年に Melzack と Wall が提唱したゲート・コントロール理論や 1979 年の下降性抑制系の発見などにより、疼痛体験は単に末梢から中枢への一方向の感覚ではなく、中枢からの関与や脊髄後角でのニューロン活動の競合の結果であることが認識されるようになった(Melzack and Wall, 1965; Basbaum and Fields, 1979)。これらの概念が提唱されて以降、一次求心性神経および脊髄後角における疼痛研究が活発に行われてきた。これまで神経障害性疼痛メカニズムに関して、脊髄後角ニューロンの興奮性の増大(Woolf, 1983; Liu et al., 1997; Nichols et al., 1999)、抑制性 GABA ニューロンの機能低下および興奮性へのスイッチ(van den Pol et al., 1996; Moore et al., 2002; Coull et al., 2003)、触覚伝達 Aβ 線維のスプラウティング（異常発芽）(Woolf et al., 1992)などの諸説が報告されてきている。しかし、これらメカニズムの中にはその重要性が疑問視されているものもあり、未だ神経障害性疼痛メカニズムの全容解明には至っていない。

痛覚伝達路の中での脊髄後角は、これまでの疼痛研究でも標的部位として取り上げられてきたが、その多くは情報伝達の主体であるニューロンのみに焦点をあてたものであった。しかしながら、末梢神経障害後に脊髄後角ニューロンの性質が変化して慢性的に疼痛が維持されるメカニズムを、ニューロンに関する諸説のみで完全に説明するのは困難であった。そのような中、近年の研究では中枢神経系を構成するグリア細胞という非神経細胞が注目されるようになり、その役割の重要性が明らかとなってきている(McMahon and Malcangio, 2009; Milligan and Watkins, 2009)。

グリア細胞は主に、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに大別され、その総数はヒトの場合で神経細胞の約 10 倍にも及ぶ（Figure 2）。これまで、グリア細胞はニューロンを栄養的、物理的に支持する受動的補助細胞として認識されていた。しかしながら、最近の研究により、グリア細胞は細胞表面に多種多様な神経伝達物質受容体を発現すること(Steinhauser and Gallo, 1996; Pocock and Kettenmann, 2007)、神経伝達物質(neurotransmitter)やグリア間の情報伝達を担うグリア伝達物質(gliotransmitter)の放出を行うこと(Koizumi et al., 2003; Gordon et al., 2005)などが示され、ニューロンーグリア間及びグリアーグリア間の情報伝達が神経活動へ大きく関与していることが明らかとなり、中枢神経系の生理的環境ならびに様々な病態においても重要な役割を有していると考えられている(Fields and Stevens-Graham, 2002; Hansson and Ronnback, 2003; Inoue et al., 2007)。

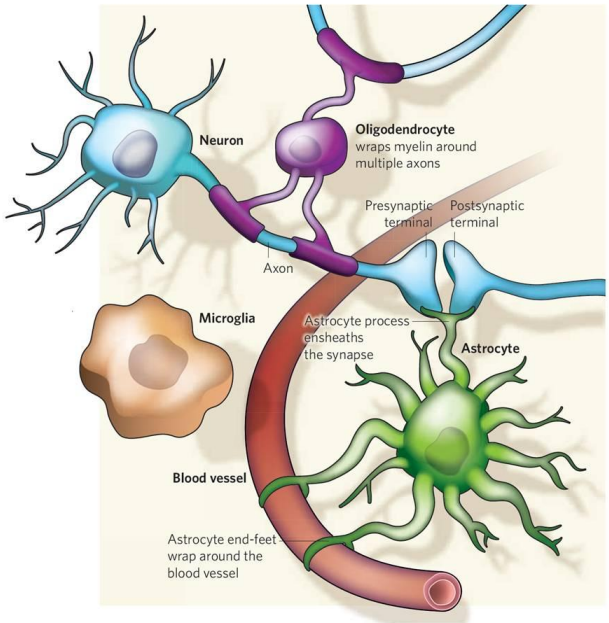


Figure 2. 中枢神経を構成するグリア細胞
(Allen and Barres, 2009)

中枢の免疫担当細胞とも呼ばれるミクログリアは、領域によって異なるが、全グリア細胞の 5~20%を占めており、通常、小さな細胞体から複数の細長

い枝分かれした突起をもつ ramified（分枝）型として存在している(Lawson et al., 1990; Kettenmann et al., 2011)。しかし、一旦神経変性や、炎症およびウイルス感染などの病態条件下におかれると、ミクログリアの突起は短縮し、細胞体が肥大化する。このような形態学的変化を伴い、ミクログリアは活性化型へと速やかに移行する(Streit et al., 1999; Nakajima and Kohsaka, 2001; Hanisch and Kettenmann, 2007; Inoue, 2008)（Figure 3）。また、近年の報告では、脳内に等間隔に点在するミクログリアが、常に自身の張り巡らした突起を活発に動かしていること、異常が発生するとその張り巡らした突起を即座に異常部位へ伸長させる応答を示すことが報告されている(Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005)。つまり、ramified 型ミクログリアは単に「resting（休止）」状態にあるのではなく、周囲の環境を常に見張っている「監視役(surveillant)」であるといえる(Raivich, 2005; Hanisch and Kettenmann, 2007)。活性化型ミクログリアは形態学的変化に伴い、生理機能や炎症応答等に重要な役割を担う各種受容体・シグナル分子の発現・活性レベルを亢進させることで機能的にも活性化する。代表的なミクログリアの細胞応答としては細胞増殖能、遊走能、サイトカイン産生・放出能、抗原提示能、貪食能などが挙げられる(Kreutzberg, 1996; Hashizume et al., 2000; Hanisch, 2002; Koizumi et al., 2007; Kataoka et al., 2009)。このように、ミクログリアは中枢神経系での異常事態に対して即座に応答し、活性化型へと移行後、周囲のニューロンおよびグリア細胞と相互作用をするなどして、異常修復あるいは病態形成に寄与する。すなわち、ミクログリアは中枢の恒常性維持に貢献する一方で、自身の活性化を契機にして中枢性疾患を発症・増悪させることも多い。実際に、アルツハイマー病(Paresce et al., 1996; Monsonego and Weiner, 2003)、パーキンソン病(Liberatore et al., 1999; Le et al., 2001; Wu et al., 2002; Zhang et al., 2005; Maguire-Zeiss and Federoff, 2010)、多発性硬化症(Jack et al., 2005; Napoli and Neumann, 2010)などの難治性中枢疾患における活性化型ミクログリアの関与を報告したものが数多くなされている。

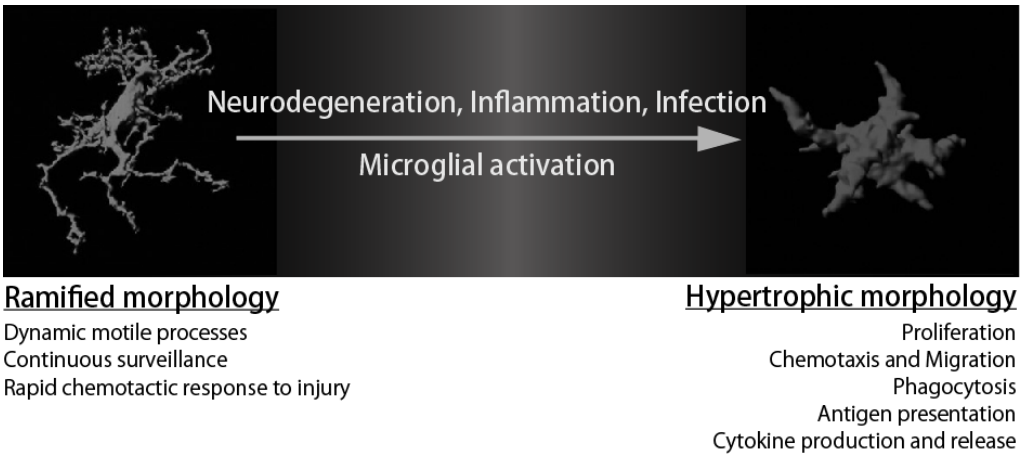


Figure 3. 活性化型ミクログリアへの移行と機能変化

一方、疼痛研究分野においてもミクログリアの活性化に焦点を置いた研究が最近広く行われてきており、その果たす役割の重要性が注目されている(Watkins and Maier, 2003; Tsuda et al., 2005; Narita et al., 2006; Beggs and Salter, 2007; Echeverry et al., 2008; Zhang et al., 2008)。特に脊髄ミクログリアの活性化は、神経障害性疼痛病態モデル動物に特徴的であることから、ミクログリアの活性化が本来ならば生体警告系である痛みを難治性疼痛へと移行させる原因となっている可能性が考えられる。

近年、我々のグループは神経障害性疼痛発症に対するミクログリアの重要な役割について一連の先駆的な報告をしてきた。神経障害性疼痛モデル動物におけるアロディニアが、イオンチャネル内蔵型 ATP 受容体の一つである P2X4 受容体に対する拮抗薬やアンチセンスオリゴヌクレオチドで抑制され、さらに P2X4 受容体が損傷側脊髄後角で活性化したミクログリア特異的に発現増加することを明らかにした(Tsuda et al., 2003)。また、*in vitro* 実験下でミクログリア培養細胞の P2X4 受容体を刺激し、その細胞と培養上清を正常ラットの脊髄くも膜下腔内に投与することでアロディニアの発現が再現された(Tsuda et al., 2003)。これらの結果は、その当時疼痛制御と全く無縁だった P2X4 受容体がアロディニア発症維持に重要な因子であるという新しい知見と共に、脊髄ミクログリアが神経障害性疼痛発症維持に深く関与するプレーヤーであることを初めて実証した成果となった。さらに、P2X4 受容体刺激によりミクログリアから放出される脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)が GABA 神経に作用し、K^+-Cl^-共輸送体（KCC2）の機能あるいは発現を抑制することで、本来抑制性である情報入力が興奮性情報として変換され、その異常興奮がアロディニア発症に寄与していることを報告した(Coull et al., 2005; Trang et al., 2009)。また、神経障害時の脊髄ミクログリアにおける P2X4 受容体の発現制御や細胞増殖に対して、IFN-γ シグナル、Lyn チロシンキナーゼシグナル、細胞外マトリックスであるフィブロネクチン、障害を受けた一次求心性神経由来のケモカイン CCL21 等が重要であることも明らかにしている(Tsuda et al., 2008b; Tsuda et al., 2008a; Tsuda et al., 2009a; Biber et al., 2011)。これら一連の報告により、神経障害性疼痛における脊髄ミクログリアの活性化と P2X4 受容体の発現の重要性がますます裏付けられ、その後のミクログリアと疼痛に関する研究の発展に及んだ（Figure 4）。

末梢神経を損傷することにより活性化する脊髄ミクログリアは、P2X4 受容体以外にも、ATP 受容体（P2X7 受容体、$P2Y_{12}$ 受容体）(Chessell et al., 2005; Kobayashi et al., 2008; Tozaki-Saitoh et al., 2008; Tsuda et al., 2010; Kobayashi et al., 2011)、Toll 様受容体(Tanga et al., 2005; Kim et al., 2007)、ケモカイン受容体（CX3CR1 受容体、CCR2 受容体）(Verge et al., 2004; Abbadie, 2005; Clark et al., 2007; Zhang et al., 2007; Zhuang et al., 2007; Abbadie et al., 2009; Clark et al., 2009)など様々な受容体群の発現を亢進させ、それぞれが疼痛制御に重要な役割を担うことが報告されている。また、それら受容体依存的あるいは非依存的に産生・放出される炎症性サイトカイ

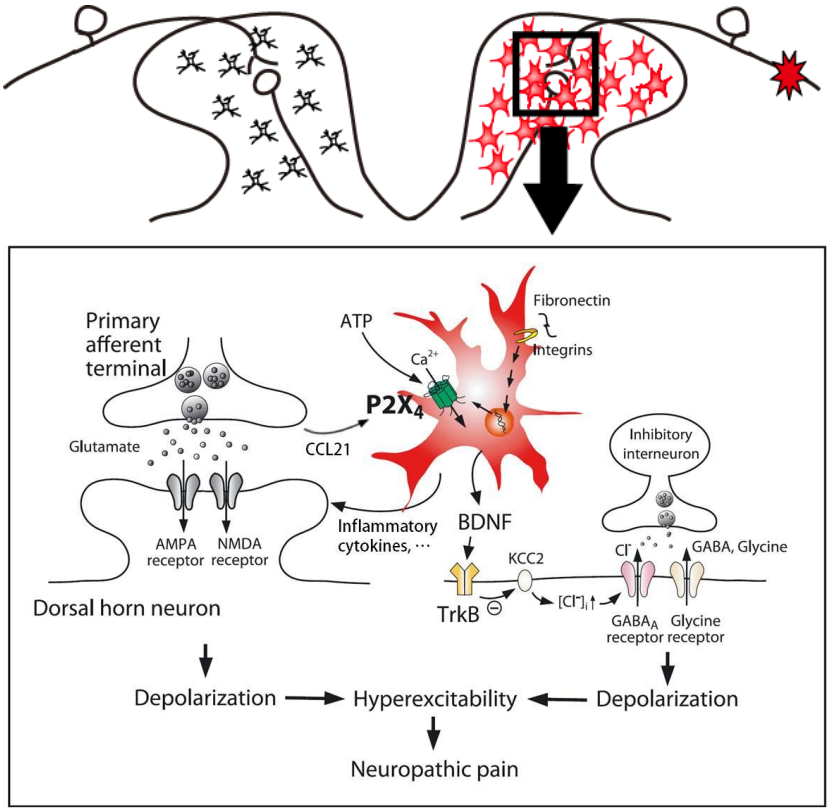


Figure 4. 脊髄後角の活性化型ミクログリアによる神経障害性疼痛調節機構(modified from Inoue et al., 2007)

ン IL-1β、IL-6、TNF-αが神経伝達の興奮性を惹起し、神経障害性疼痛に寄与することが明らかとなっている(Inoue, 2006; Kawasaki et al., 2008a)。最新の研究では、それら炎症応答に必要とされる様々な遺伝子群の発現誘導をグローバルに制御する転写因子として interferon regulatory factor-8（IRF8）が同定された（増田隆博博士論文 2011）。IRF8 は末梢神経損傷後、脊髄ミクログリアで特異的に発現増加する。また、IRF8 欠損マウスや、siRNA 投与による IRF8 ノックダウンマウスでは、神経損傷後のアロディニア症状が緩和され、さらに神経障害性疼痛モデル動物にみられる脊髄内での炎症性遺伝子群の発現増加が著しく抑制される。このことは培養ミクログリア細胞を用いた検討でも確認されている。すなわち、神経障害性疼痛におけるミクログリアの役割ならびに活性化型ミクログリア自体の性質を決定づける要素として IRF8 などの転写因子が極めて重要であり、このような転写レベルでのミクログリアの機能制御が病態に強く関与することが示唆された。しかしながら、末梢神経損傷後の脊髄ミクログリアにおいて、どのようなメカニズムで、どのような質的変化が引き起こされるかというのはあまり分かっていない。したがって、神経損傷後に脊髄の ramified 型ミクログリアが活性化型ミクログリアへとシフトする際の引き金となる因子を特定することは、病態の全容解明に向けて必要な課題である。

ミクログリアの発生起源には、造血幹細胞由来あるいは神経幹細胞由来の説があり、様々な議論が長年続いていたが、近年、成熟マウスにおける中枢常在性のミクログリアが胎生期の原始マクロファージに由来するということが報告された(Ginhoux et al., 2010; Ransohoff and Cardona, 2010; Saijo and Glass, 2011)（Figure 5）。通常時の ramified 型ミクログリアはその形態や挙動がマクロファージと異なるが、活性化したミクログリアは前述の通り、高い遊走能、貪食能、抗原提示能、サイトカイン産生・放出能など、マクロファージと共通する免疫応答を引き起こす。すなわち、中枢のマクロファージとも比喩されるミクログリアは、その起源や病態時の応答性など、実質的にマクロファージと類似した多くの特徴を有しているといえる。

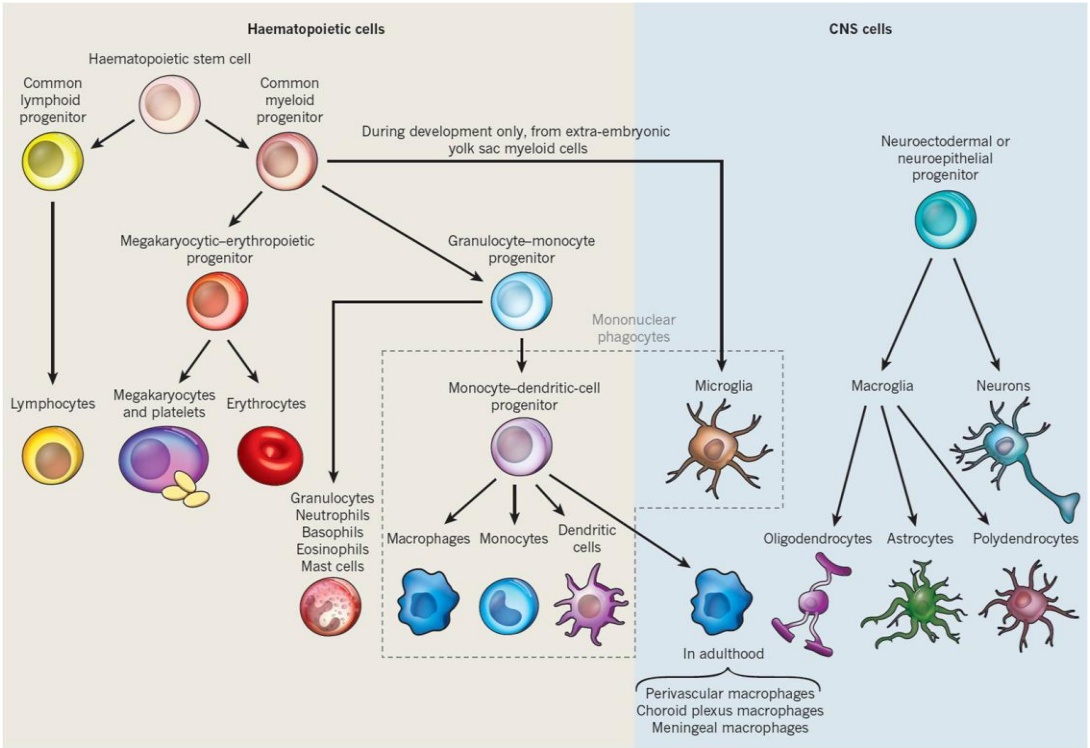


Figure 5. 造血系細胞と中枢神経系細胞の細胞系譜(Ransohoff and Cardona, 2010)

マクロファージは骨髄前駆細胞からの転写因子依存的な分化誘導を受ける。その過程において、マクロファージへの分化を方向づける重要な転写因子として MafB（v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B）の役割が報告されている(Kelly et al., 2000; Bakri et al., 2005; Friedman, 2007)。

MafB は塩基性ロイシンジッパー（bZIP）型転写因子である Maf 転写因子ファミリーに属する。Maf ファミリーは、元来、筋腱膜性線維肉腫から単離された鳥レトロウイルス AS42 の癌遺伝子として発見された v-maf に由来し、その分子サイズによって 149～162 アミノ酸残基から成る小 Maf 群と 236～370 アミノ酸残基から成る大 Maf 群とに大別される(Nishizawa et al., 1989; Hang and Stein, 2011)。小 Maf 群転写因子には MafF、MafG、MafK が存在し、それらは二量体形成や DNA 結合に関与する bZIP 構造ドメインを有するが、転写活性ドメインを欠いている。大 Maf 群転写因子には MafA、MafB、c-Maf（Maf）、Nrl が存在し、C 末端側に bZIP 構造ドメイン、N 末端側に転写活性や SUMO タンパク質結合に関与する酸性ドメインを有する（Figure 6）。これら転写因子は、脳、網膜、水晶体、腎臓、膵臓などの組織特異的な遺伝子発現や細胞分化における重要な制御因子として認識されている(Kataoka, 2007; Eychene et al., 2008)。さらには、癌遺伝子として働くことも知られ、特に MafB は多発性骨髄腫に関与する（(Bergsagel and Kuehl, 2005; van Stralen et al., 2009)）。

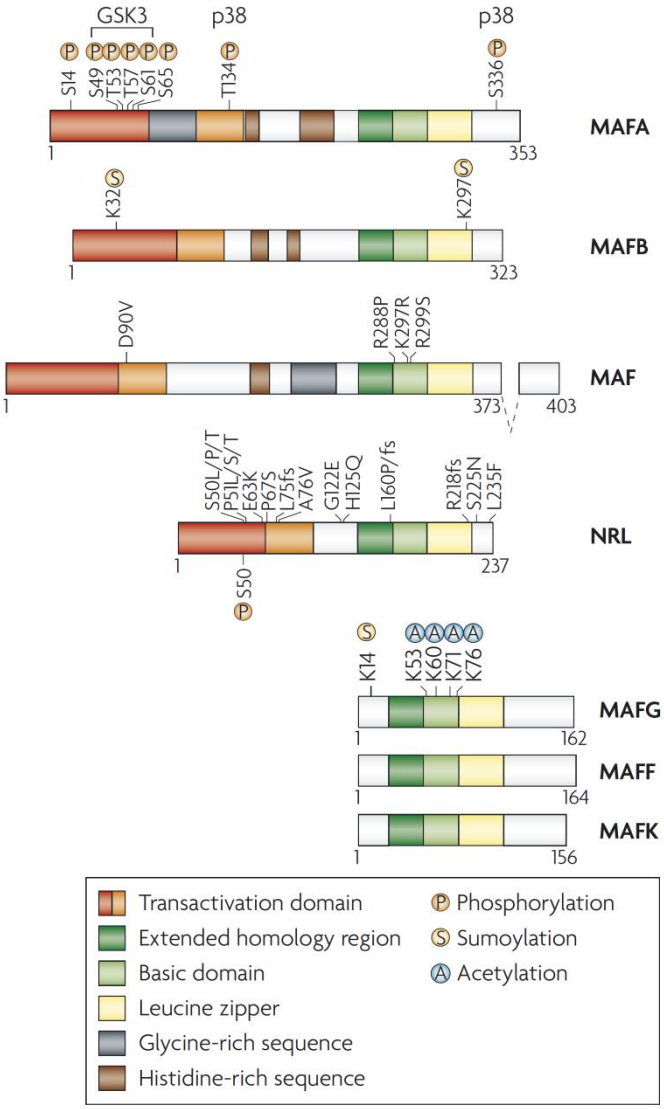


Figure 6. Maf ファミリーの構造(Eychene et al., 2008)

MafB は造血系細胞の細胞系譜において、マクロファージに特異的に発現するため、MafB の発現がマクロファージの特性を決定する可能性が示唆される。しかしながら、そのような転写因子 MafB に関して、中枢のマクロファージと呼ばれるミクログリアでの発現やその役割を示した研究報告はこれまで一切なされていない。

そこで本研究では、通常状態のミクログリアが、機能的にマクロファージにより近い活性化型ミクログリアへとシフトする際の契機として MafB が機能するのではないかという着想のもと、末梢神経損傷後の脊髄ミクログリアでの MafB 発現およびその神経障害性疼痛における役割を解明することを目的として、詳細な研究を行った。

1. 実験方法

1-1　実験材料および試薬調製法

(1) 使用動物

本実験では、8-12 週齢 C57BL/6 雄性マウスを日本クレア株式会社より購入した。P2X4 受容体欠損マウス（p2rx4ko マウス）は東京大学の安藤先生より、CCL21 欠損マウス（plt マウス）は東邦大学の桑原先生より御供与頂いた。8 時から 20 時までを明期、20 時から 8 時までを暗期とする規則的明暗周期の環境下、滅菌済みチップ（床敷き）の入ったプラスチックケージ内で飼育し、水と飼料は自由に摂取させた。脊髄くも膜下腔内にカテーテルを留置したマウスは、ケージ内収容数 1 匹で飼育した。

(2) 免疫染色用抗体

Anti-MafB rabbit polyclonal antibody (Calbiochem)
Anti-Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) rabbit polyclonal antibody (Wako)
Anti-CD11b (OX-42) rat monoclonal antibody (Clone 5C6) (Serotec)
Anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) rat monoclonal antibody (Clone 2.2B10) (Zymed Lab)
Anti-APC (CC1) mouse monoclonal antibody (Clone CC1) (Calbiochem)
Anti-NeuN (neuronal nuclei) mouse monoclonal antibody (Clone A60) (Chemicon)
Anti-CD68 (ED-1) rat monoclonal antibody (Clone ED1) (Serotec)
Alexa Fluor™ 488/546 conjugated with goat anti-mouse/rat/rabbit IgG antibody (Molecular Probes)

(3) 試薬

大塚生食注（大塚製薬）
キシロカイン注射液 0.5%（アストラゼネカ）
ゲンタシン注 10（シェリングプラウ）
生細胞数測定試薬 SF（nacalai tesque）
ネンブタール注射液（アボットラボラトリーズ）
ノベクタン L スプレー（三菱ウェルファーマ）
エスカイン（吸入麻酔剤）（マイラン製薬株式会社）
Chloroform (Hayashi Pure Chemical)
Click-iT EdU Alexa Fluor 555 Imaging Kit (Invitrogen)
DNase Ⅰ (Roshe)
Dulbecco’s modified eagle medium (DMEM) (GIBCO)
Easy dilution (Takara)
ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences)
5-ethynyl-2’-deoxyuridine (EdU) (Invitrogen)

Ethanol (nacalai tesque)
Fetal bovine serum (FBS) (GIBCO)
Formaldehyde solution (Wako)
Glycerol (Wako)
Glycogen (nacalai tesque)
Horse serum (HS) (GIBCO)
2-Mercaptoethanol (SIGMA)
Methanol (nacalai tesque)
Normal goat serum (Vector Labolatories Inc.)
O.C.T compound (SAKURA)
Paraformaldehyde (Wako）
Penicillin-streptomycin liquid (GIBCO)
Phenol: Chroloform: IsoamylAlchol (25: 24: 1, Invitrogen)
Phosphate buffered saline (-) (PBS(-)) (GIBCO)
Phusion DNA Polymerase (Finnzymes)
Poly-L-lysine (SIGMA)
Premix Ex Taq (Takara)
PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara)
2-Propanol (nacalai tesque)
Random 6 mer primer (Takara)
RNA later solution (Ambion)
RNase-free water (GIBCO)
RNase inhibitor (Promega)
RNeasy mini plus kit (Qiagen)
Sucrose (Wako)
TRIsure (Nippon genetics)
Triton X-100 (Wako)
Trypan blue stain 0.4% (GIBCO)
0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO)
UltraPure dNTP Mix (Clontech)
VectaShield (Vector Labolatories Inc.)

（4）試薬調製法

(A) 免疫組織染色用試薬

(a) 4% paraformaldehyde 溶液

PBS(-)に 40 g/L の paraformaldehyde 粉末を加え、加熱溶解した。溶解後、室温まで冷やし、溶液の pH を 7.4 に調製後、4℃に冷却して使用した。

(b) 30% sucrose 溶液

PBS(-)に 30 % (w/v)の sucrose 粉末を加え、溶解後 4℃で冷却した。

(c) Blocking buffer

0.3% Triton X-100/PBS(-)溶液に最終濃度が 3.0% (v/v)となるように normal goat serum を加えて調製した。

(B) 免疫細胞染色用試薬

(a) 3.7% Formaldehyde 溶液

37% Formaldehyde solution を PBS(-)で 10 倍希釈し、pH を 7.4 に調製して使用した。

(b) Blocking buffer

0.3% Triton X-100/PBS(-)溶液に最終濃度が 3.0% (v/v)となるように normal goat serum を加えて調製した。

(C) ミクログリア用培養液

初代培養ミクログリア用培養液は、DMEM、10% FBS、50 unit/ml penicillin、50 μg/ml streptomycin を混合して調製した。細胞株 BV2 ミクログリア用培養液は、DMEM、5% FBS、50 unit/ml penicillin、50 μg/ml streptomycin、2 mM Glutamate を混合して調製した。

1-2　神経障害性疼痛病態モデルマウス作製法

神経障害性疼痛病態モデルマウスの作製には、脊髄神経損傷モデルの作製法(Kim and Chung, 1992)を改変して行った（Figure 7）。2%フォーレン麻酔下（98%酸素）、マウスをうつ伏せに置き、腰骨の突起より L5 腰髄の位置を確認した後、背側正中線よりもやや損傷側の皮膚を正中線に沿って切開した。さらに筋膜を切開し、開創器で視野を広げた後、L5 横突起の上部の筋肉を剥離し、横突起を露出させた。その後、ドリルを用いて L5 横突起の根元付近に溝をつくり、神経を損傷させないように穏やかに横突起を除去した。除去した L5 横突起の直下に L4 脊髄神経が確認できるので、これを切断した。筋膜および皮膚

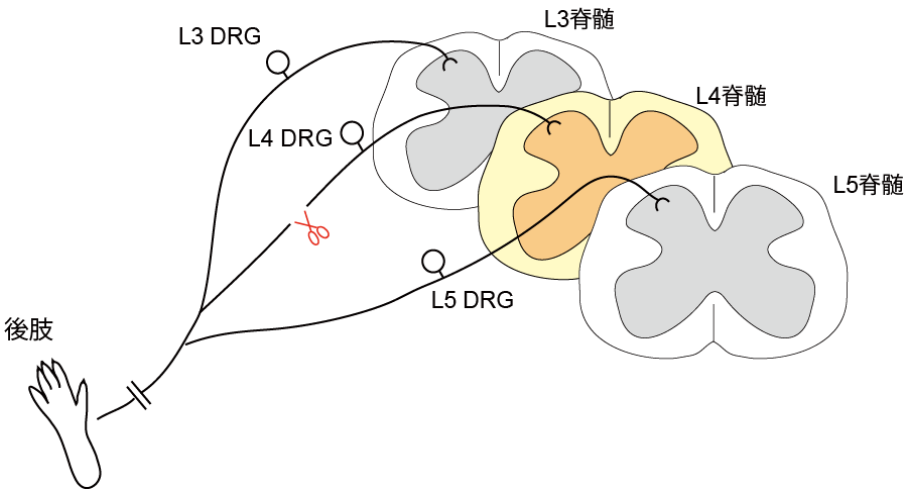


Figure 7. 神経障害性疼痛モデルマウス作製法

を 3-0 絹糸で縫合し、0.5 mg/ml ゲンタシンで消毒した後、ノベクタンスプレーで傷口を保護し、同濃度のゲンタシンを 0.1 ml 腹腔内投与した。

1-3　痛み行動測定法および軽度機械刺激に対する痛み閾値算出法

（1）痛み行動の測定法

von Frey filament を用いた Up and down 法(Dixon, 1980; Chaplan et al., 1994)により、触刺激に対する痛み行動の測定を行った。Up and down 法の詳細は次項で述べる。マウスをアルミ製メッシュ板の上に乗せ、適当なケージを上から被せ、30 分間から 1 時間順応させた。その後、床下面よりフィラメントをマウスの足底部に接触させ、フィラメントが軽く湾曲する程度に力を加えた。フィラメントの湾曲状態を 3 秒間保持し、脚を素早く退ける、足を舐めるといった痛み行動の有無を確認した。沈静していない動物には、落ち着くまでフィラメントを接触させなかった（Figure 8）。

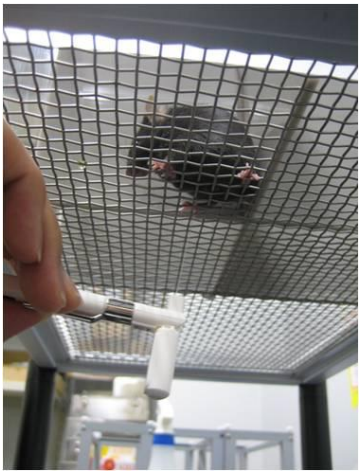


Figure 8. マウスのアロディニア行動測定風景

（2）50%閾値算出法

von Frey filament は刺激強度の異なる 6 本のフィラメント（No. 2.44（0.04 g）～No. 4.31（2.0 g））を用いた。No. 3.22（0.16 g）のフィラメントから測定を開始し、各フィラメントで痛み行動を起こさなかった場合は〇（クリア）として一段階強いフィラメントに移り、痛み行動を起こした場合は×（失敗）として一段階弱いフィラメントで再度測定を行った。初めて〇と×が入れ替わった測定からさらに 4 回測定を繰り返し、その〇と×の順序と最後に用いたフィラメントの番号から、下式を用いて 50%閾値を算出した。また、最も太い No. 4.31（2.0 g）のフィラメントをクリアした動物については、その閾値を一律 2.0 g とした。

$$50\%\text{閾値(Paw withdrawal threshold) (g)} = 10^{(Xf + (k \times 0.224))} / 10{,}000$$

Xf : 最後に用いたフィラメントの値

k : 〇と×の順序により決定される値

1-4　脊髄腔内カテーテル留置手術法

（1）カテーテル作製法

針金入り 32G カテーテルの端から 2.9 cm 付近に印を付け、その付近で結び目を作る。結び目のさらに外側でカテーテルを切断し、その切断側を約 3 cm に切断した PE-10 カテーテルの一端にわずかに挿入する。2 本のカテーテルを接着剤で結合させた後、32G カテーテル内の針金を、PE-10 カテーテルのもう一端から 1 cm 程度出るまで移動させた。32G カテーテルの結び目に 5-0 絹糸を通し、2 回結ぶことで固定した。カテーテルを使用する前には、挿入部分を 70%エタノールで消毒

し、カテーテル内部に PBS(-)を満たした。

(2) 脊髄腔内カテーテル留置手術

脊髄腔内カテーテル留置手術は Yaksh 等の方法(Yaksh et al., 1980)を参考にした。2%フォーレン麻酔下（98%酸素)、マウスを両耳道で固定し、両耳間の正中線に沿って皮膚を切開した後、頭蓋骨ー第一脊椎骨間の硬膜が現れるまで筋肉を剥離した。硬膜に 26G 針を用いて穴を開け、脊髄液が溢れ出すのを確認した。この穴から PBS(-)を充填したカテーテルを緩やかに脊髄腔内へ挿入した。カテーテル途中に作った結び目まで挿入することにより、カテーテルの先端が L4 脊髄付近に到達する。続いて、切開部より約 1 cm 程尾側部位から切開内部に 20G 針を入れ、その針を通してカテーテルを皮膚の外へと露出した。カテーテルの結び目に固定していた 5-0 絹糸を用いて、結び目を近傍の筋肉に固定した。その後、結び目を押さえながらピンセットを用いてカテーテル内部の針金を抜き取った。最後に、筋肉および皮膚を 3-0 絹糸で縫合し、0.5 mg/ml ゲンタシンで消毒した後、ノベクタンスプレーで傷口を保護し、同濃度のゲンタシンを 0.1 ml 腹腔内投与した。引き続き麻酔下において、カテーテル先端より PBS(-)を 3 μl 投与した。PBS(-)投与時に肢が動いた場合は手術失敗の可能性が高いため、このような動物は実験に使用しなかった。また、麻酔から覚醒した後、歩行行動等を観察し、運動障害が観察された動物も実験に使用しなかった。施術 1 週間後に 0.25%キシロカインを 3 μl 投与し、後肢の一過性の麻痺を観察することで、カテーテルの先端が正しく L4 脊髄付近に到達していることを確認した。

1-5　初代培養ミクログリアの調製法および培養法

生後 0－1 日のマウス新生仔を 70%エタノールで消毒した後断頭し、スパーテルで全脳を取り出し、氷冷 PBS(-)中に浸して洗浄した。実態顕微鏡観察下で、髄膜、血管および小脳をピンセットで剥離し、集めた脳実質をメスで 2 分間程度ミンスした。固まりが残ってないことを確認し、0.25% Trypsin-EDTA 5 ml を加え、ミンスした脳組織と共に 50 ml ファルコンチューブに移した。さらに 5 ml の Trypsin-EDTA で洗いこみ、37℃の水浴で 10 分間振盪した。その後、余熱で 0.5 ml DNase I (10 mg/ml) と 30 秒間反応させ、溶出した DNA を分解した。組織分散液の粘性が低下したのを確認して Trypsin の反応をウマ血清 5 ml の添加により停止し、PBS(-)を加えて全量 45 ml とした後、1000×g で 6 分間遠心した。上清を取り除いたペレットにミクログリア用培養液を 10 ml 加え、数回ピペッティングを行うことで沈殿をほぐし、100 μm セルストレイナー (FALCON）に通した。さらに 10 ml の培養液でセルストレイナーを洗い、50 ml ファルコンチューブに回収した。予め 10 μg/ml Poly-L-lysine でコーティングした 75 cm^2 フラスコ (Corning）に $1.5－2\times10^7$ cells/10 ml/flask になるように播種し、37℃、10% CO_2 のインキュベーター内で培養した。培養開始後 2 日目に最初の培地交換を行い、以後は 2、3 日ごとに培地交換を行った。培養開始から 9～15 日目のフラスコより、アストロサイトの細胞層上にある浮遊性のミクログリアを分離した。ミクログリアの分離を行う前日に、ミクログリア用培養液の培地交換を行い、回収する細胞液を新しいものにした。ミクログリア細胞の分離は振幅約 20 cm で、毎分 60 回の速さで 2 分間振盪することにより行った。フラスコよりミクログリアを

含む培養上清を取り、各実験に適当な細胞数、培養ディッシュ等に均等に播種した。その後 37℃、10% CO_2 のインキュベーター内で 1 時間静置し、ミクログリア細胞を接着させ、各実験に用いた。

1-6　薬物処置法

（1）動物実験

(A) MafB 標的 siRNA の脊髄腔内投与法

マウスの MafB 遺伝子を標的とする 2 種類の siRNA（si63, si65）およびコントロール（siC）の siRNA は、invitrogen 社の stealth siRNA を用いた。導入試薬には Lipofectamine™ RNAiMAX（invitrogen）を用いた。100 μM の siRNA と導入試薬 RNAiMAX をそれぞれ PBS(-)で 10 倍希釈し、混和後、20 分間室温でインキュベーションした。脊髄腔内カテーテル留置手術を施したマウスの痛み行動を前測定した後、最終投与量が 20 pmol となるように siRNA 試薬溶液を 2 μl 脊髄腔内に注入し、さらに PBS(-)を 3 μl 注入することでカテーテル内の試薬溶液を流し出した。

本実験に使用した siRNA の配列は以下の通りである（Table 1）。

siC	sense	CAGUGGAGGCGUCUUUACUCGAUCA
	antisense	UGAUCGAGUAAAGACGCCUCCACUG
si63	sense	GCGUCCAGCAGAAACAUCACCUGGA
	antisense	UCCAGGUGAUGUUUCUGCUGGACGC
si65	sense	GAGAAACUCGCCAACUCCGGCUUCA
	antisense	UGAAGCCGGAGUUGGCGAGUUUCUC

Table 1.　MafB 標的 siRNA の配列

(B) CCL21 の脊髄腔内投与法

マウスリコンビナントの CCL21 粉末を PBS(-)にて 100 μg/ml に希釈後、さらに PBS(-)溶液を用いて 30 μg/ml に用時調製した。脊髄腔内カテーテル留置手術を施したマウスの痛み行動を前測定した後、最終投与量が 60 ng となるように CCL21 溶液を 2 μl 脊髄腔内に注入し、さらに PBS(-)を 3 μl 注入することでカテーテル内の試薬溶液を流し出した。

(C) EdU の腹腔内投与法

EdU 粉末を PBS(-)にて用時希釈し、マウスを paraformaldehyde 固定する 2 時間前に腹腔内に 0.2 ml (50 mg/kg)単回投与した。

（2）細胞実験

(A) MafB 標的 siRNA

siRNA は先述の動物実験と同様のものを用いた。導入試薬も同様の Lipofectamine™ RNAiMAX（invitrogen）を用い、細胞への処置法はそのプロトコールに従って、最終濃度が 10 nM になるよ

うに処置した。処置 6 時間後に細胞培養液を交換し、処置 48 時間後に各実験に用いた。

(B) MafB 標的 shRNA 発現レンチウイルスベクター

(a) レンチウイルスベクター作製法

マウスの MafB 遺伝子を標的とする 2 種類の shRNA 配列（sh6, sh21）、および標的配列が存在しないスクランブルのコントロール shRNA（shC）配列をデザインした（Table 2）。さらに同じコンストラクト上に導入効率確認のためのレポーター遺伝子 EGFP を EF プロモーター下に組み込み、それぞれを pENTR4-H1 プラスミドベクター（RIKEN）にクローニングしてエントリークローンを得た。シークエンス解析により陽性クローンを確認後、エントリークローンと CSⅡレンチウイルスベクターの間で、Gateway cloning system（Invitrogen）を用いた組み換え反応を行った。その陽性クローンをシークエンス解析により確認後、目的レンチウイルスベクターとした（Figure 9）。その後、それぞれの組み換えプラスミドベクター（H1-shRNA-EF-EGFP）を、パッケージングプラスミドベクター（pCAG-HIVgp）とエンベローププラスミドベクター（pCMV-VSV-G-RSV-Rev）とともに、PEI（polyethylenimine）を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションさせた。37℃、5% CO_2 のインキュベーターで 12 時間培養後、培養液を forskolin（10 μM）の入った新しい培養液に交換し、さらに 48 時間培養した。その後、培養上清をろ過し、濃縮のため、10% w/v となるように PEG（polyethylene glycol）を加えて 4℃で一晩インキュベーションした。その後、2,600×g で 30 分間遠心し、得られたペレットを PBS(-)で再懸濁させることによりウイルスベクターを得た。ウイルスベクターのタイターは、BV2 細胞に導入後の GFP 発現率により決定した。

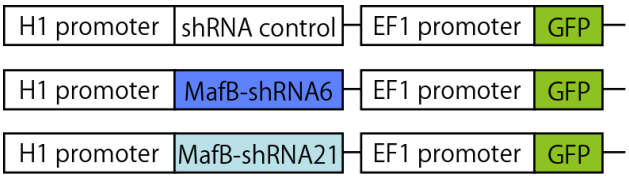


Figure 9. MafB 標的 shRNA 発現レンチウイルスベクターのコンストラクト

shC	sense	GCCCGAGTTGATCTATCAA
	antisense	TTGATAGATCAACTCGGGC
sh6	sense	ACGGCTTCGATCTTCTCGA
	antisense	TTGAGAAGGTCGAAGTCGT
sh21	sense	AGTAACTATCAGCAGGTGA
	antisense	TCATCTGCTGGTAGTTGCT

Table 2.　MafB 標的 shRNA の配列

(b) BV2 細胞への処置法

37℃、5%CO_2 のインキュベーター内で培養した BV2 細胞を各実験用に適宜 6 ウェルプレート、24 ウェルプレート、96 ウェルプレートに播種し、数時間培養することで接着させた。その後、タイターをそろえた各種の精製ウイルスを処置し、12 時間培養後、培養液を交換し、さらに 60 時間培養後、各実験に用いた。

(C) CCL21

マウスリコンビナントの CCL21 粉末を PBS(-)にて 100 μg/ml に希釈後、PBS(-)溶液あるいは細胞培養液を用いて各濃度に用時調製した。初代培養ミクログリア細胞には、最終濃度が 10 ng/ml となるように処置した。

(D) Lipopoly-saccharide (LPS)

LPS 粉末を PBS(-)にて 100 μg/ml に希釈後、PBS(-)溶液あるいは細胞培養液を用いて各濃度に用時調製した。BV2 細胞には、最終濃度が 100 ng/ml となるように処置した。

1-7　免疫組織染色法

(1) マウス脊髄組織固定法および免疫組織染色用サンプル作製法

マウスにソムノペンチル注射液（50 mg/ml）を 0.2 ml 腹腔内投与した。翻尾反射の消失を確認した後、直ちに腹部を切開し、心臓より PBS(-)溶液 20 ml を灌流して脱血した。続いて、氷冷した 4% paraformaldehyde 溶液 40~50 ml を灌流することにより全身組織を固定後､動物を約 1 時間氷冷した。続いて、脊髄組織を摘出し、実体顕微鏡下で目的部位の第 4 腰髄を単離した。単離した脊髄は氷中静置後 4～5 時間経過するまで 4% paraformaldehyde 溶液中にて浸漬固定を行った。その後、冷 30% sucrose 溶液中に脊髄を移し、4℃で 24 時間振盪した。翌日、脊髄が 30% sucrose 溶液中に沈んでいることを確認した後､脊髄を取り出し､付着している溶液をペーパータオルで吸い取った｡最後に、脊髄を O.C.T Compound に包埋し、ドライアイス上で急速凍結させ、使用するまで－80℃で保存した。

(2) 免疫組織染色法

－80℃で保存していた包埋脊髄サンプルを、クライオスタット（Leica）内で－20℃の条件下、約 30 分静置した。その後、クライオスタットを用いて 30 μm 厚の脊髄切片を作製した後、PBS(-)中に移し、組織周辺の O.C.T Compound を溶解させた。こうして得られた脊髄切片を 0.3% Triton X-100 / PBS(-)溶液中で振盪しながら洗浄した。洗浄後、blocking buffer 中、室温で 2 時間ブロッキングした。その後、一次抗体反応を行った。一次抗体反応溶液には、blocking buffer に、抗 MafB 抗体は 5000 倍、抗 Iba1 抗体は 2000 倍、抗 CD11b 抗体は 1000 倍、抗 GFAP 抗体は 1000 倍、抗 APC 抗体は 200 倍、抗 NeuN 抗体は 200 倍、抗 CD68 抗体は 500 倍希釈したものを用い、4℃で 48 時間反応させた。反応終了後、0.3% Triton X-100/PBS(-)で洗浄し、二次抗体反応を行った。二次抗体反応溶液には、蛍光色素 Alexa488 あるいは Alexa546 をラベルした、抗ウサギ IgG 抗体あるいは抗マウス IgG 抗体を blocking buffer に 1000 倍希釈したものを用い、室温暗所で 3 時間反応させた。反応終了後、暗所において、0.3% Triton X-100 / PBS(-)溶液および PBS(-)溶液で洗浄した。その後、脊髄切片を Aminopropyltriethoxisilane (APS)コートスライドグラスに貼り付け、切片周囲の余分な PBS(-)を除去した後、乾燥させた。続いて、退色防止剤 VectaShield（with DAPI）をスライドグラスに滴下し、カバーガラスをかけ、VectaShield が乾燥するまで暗所に静置し、その後 4℃で保存し

た。観察には共焦点レーザー顕微鏡（LSM510, Zeiss）を使用した。

EdU 検出反応は二次抗体の洗浄後、添付のプロトコールに従って行った（Click-iT EdU Alexa Fluor 555 Imaging Kit, Invitrogen）。

1-8　免疫細胞染色法

APS コートスライドガラスに 12 ウェルフレキシパームを貼り付け、そのウェル内に初代培養ミクログリア細胞あるいは BV2 細胞を播種し、培養ならびに各実験を行った。その後、細胞培養液を除去してただちに冷 3.7% formaldehyde 溶液を加え、室温で 30 分静置させることで細胞を固定した。続いて、PBS(-)で洗浄し、blocking buffer を加えて室温で 15 分間ブロッキングした後、一次抗体反応を行った。一次抗体反応溶液には、blocking buffer に、抗 MafB 抗体は 2500 倍、抗 OX-42 抗体は 1000 倍に希釈したものを用い、4℃で一晩反応させた。反応終了後、PBS(-)で洗浄し、二次抗体反応を行った。二次抗体反応溶液には、蛍光色素 Alexa488 をラベルした抗ウサギ IgG 抗体、Alexa546 をラベルした抗マウス IgG 抗体を、blocking buffer で 1000 倍に希釈したものを用い、室温暗所で 1 時間反応させた。反応終了後、暗所において、PBS(-)で洗浄し、スライドガラスからフレキシパームを取り外して乾燥させた。続いて、退色防止剤 VectaShield（with DAPI）をスライドグラスに滴下し、カバーガラスをかけ、VectaShield が乾燥するまで暗所に静置し、その後 4℃で保存した。観察には共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

1-9　定量的リアルタイム RT-PCR 法

（1）total RNA 調製法

(A) 組織および培養細胞の可溶化法

マウスにソムノペンチル注射液 (50 mg/ml) を 0.2 ml 腹腔内投与した。翻尾反射の消失を確認した後、直ちに腹部を切開し、心臓より PBS(-)溶液 20 ml を灌流して脱血した。続いて、脊髄組織を摘出して実体顕微鏡下で目的部位の第 4 腰髄を単離し、冷 RNA later 溶液中に浸した。その後、脊髄組織を glycogen (0.25 mg/ml) を含む TRIsure 溶液に移し、氷冷下で約 10 秒間ホモジネートした後、RNA 抽出を行った。

また培養細胞では、24 ウェルプレートに播種した BV2 細胞を、glycogen (0.25 mg/ml) を含む TRIsure 溶液で可溶化し、RNA 抽出を行った。

(B) RNA 抽出法

TRIsure 溶液 300 μl に chloroform を 60 μl 加え、充分に混和後、2 分間静置した。4℃、15000 rpm の条件（以下、遠心条件は同一）で 15 分間遠心し、水層と有機溶媒層に分離させた。その後、RNA を含む水層のみを回収し、等量の 2-isopropanol を加えて混和後、－20℃で 30 分間インキュベートした。続いて 10 分間遠心し、上清を除去した後、RNA 沈殿に 75% ethanol を 500 μl 加え、

5 分間遠心して沈殿を洗浄した。上清を除去し、RNA 沈殿を風乾させ、RNase free water 12 μl に溶解させた。さらに RNase-free DNase Ⅰ (0.4 unit RNase inhibitor, 3 unit DNase I) を加え、37℃で 30 分間インキュベートした。その後、RNase-free water 70 μl、phenol: chloroform: isoamylalchol (25: 24: 1) 100 μl を加えて混和し、15 分間遠心した。遠心により分離した水層のみを回収し、再び 2-isopropanol による沈殿、ethanol による洗浄を行った。洗浄、乾燥後に得られた RNA 沈殿に RNase-free water 10 μl を加えて溶解し、Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop) を用いて RNA 濃度を測定した。

(2) 逆転写法

抽出した RNA サンプルを RNase-free water で濃度 50 ng/μl に希釈し、PrimeScript Reverse Transcriptase 取扱説明書 (Takara)のプロトコールに従って逆転写反応を行った。反応液中には、5x PrimeScript Buffer、PrimeScript RT Enzyme Mix I、Oligo dT Primer (50 μM) 、Random 6 mers (100 μM) 、total RNA 250 ng が含まれる。T Gradient (Biometra) を用いて 37℃ 15 分、85℃ 5 秒の反応を行った後、反応液を 4℃に保存し、リアルタイム PCR 反応に用いた。

(3) リアルタイム PCR 法

定量的リアルタイム PCR 反応は、Premix Ex Taq (Takara)あるいは SYBR THUNDERBIRDqPCR Mix（Toyobo）取扱説明書の一部改変したプロトコールに従って行った。調製した cDNA に特異的プライマー(Forward、Reverse)、TaqMan プローブ、Premix Ex Taq、ROX Reference Dye Ⅱ を混和し、ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて PCR を行った。内標準として 18s ribosomal RNA の Primer および Probe は、Applied Biosystems より購入した。得られた結果は検量線法を用いて、7500 System SDS Software 1.3.1 (Applied Biosystems) により解析した。

使用した probe と primer の配列は以下の通りである（Table 3)。

gene		5' to 3' sequence
mafB	Forward primer	GCCTTCTTCTCCCAGCTTCA
	Reverse primer	TCGGGATTCATCTGCTGGTAGT
	Taqman Probe	TCCGACTGAACAGAAGACCCATCTCGA
p2rx4 (purinergic receptor P2X4)	Forward primer	ACAACGTGTCTCCTGGCTACAAT
	Reverse primer	GTCAAACTTGCCAGCCTTTCC
	Taqman Probe	CAATGAGCAACGCACACTCACCAAGG
p2rx7 (purinergic receptor P2X7)	Forward primer	TGCAGCTGGAACGATGTCTT
	Reverse primer	CCAAAGCAAAGCTCTAATGTAGGAA
	Taqman Probe	TATGAGACAAACAAAGTCACCCGGATCCA
p2ry6 (purinergic receptor P2Y6)	Forward primer	AACCGCACTGTGTGCTACGA
	Reverse primer	GCGACAATAACAAGCCAGTAAGG
	Taqman Probe	TGGCCCTCACGGTCATCGGC

p2ry12 (purinergic receptor P2Y12)	Forward primer	TGAAGACCACCAGGCCATTT
	Reverse primer	AGGCCCAGATGACAACAGAAA
	Taqman Probe	AAACGTCCAGCCCCAGCAATCTCTTG
tlr2 (toll-like receptor 2)	Forward primer	TCACCGTCATCAGCATCGA
	Reverse primer	CTGCACTGTCCGGTTGTTCA
	Taqman Probe	ATCGTCCTGGCCGCCAACTCC
tlr4 (toll-like receptor 4)	Forward primer	AAACTTGCCTTCAAAACCTGGC
	Reverse primer	ACCTGAACTCATCAATGGTCACATC
	Taqman Probe	CACGTCCATCGGTTGATCTTGGGAGAA
il1b (interleukin 1 beta)	Forward primer	GAAAGACGGCACACCCACC
	Reverse primer	AGACAAACCGCTTTTCCATCTTC
	Taqman Probe	TGCAGCTGGAGAGTGTGGATCCCAA
il6 (interleukin 6)	Forward primer	GGGACTGATGCTGGTGACAA
	Reverse primer	TGCCATTGCACAACTCTTTTCT
	Taqman Probe	TCACAGAGGATACCACTCCCAACAGACCTG
tnf (tumor necrosis factor-alpha)	Forward primer	GTTCTCTTCAAGGGACAAGGCTG
	Reverse primer	TCCTGGTATGAGATAGCAAATCGG
	Taqman Probe	TACGTGCTCCTCACCCACACCGTCA
ctss (cathepsin S)	Forward primer	TACATTCAGCTCCCGTTTGGT
	Reverse primer	TCGTCATAGACACCGCTTTTGT
	Taqman Probe	TCGACGCCAGCCATTCCTCCTTCT
iba1 (ionized calcium binding adapter molecule 1)	Forward primer	GATTTGCAGGGAGGAAAAGCT
	Reverse primer	AACCCCAAGTTTCTCCAGCAT
	Taqman Probe	CAGGAAGAGAGGCTGGAGGGGATCAA
ccnd2 (cyclin D2)	Forward primer	CAGCAGGATGATGAAGTGAACA
	Reverse primer	GCTTTGAGACAATCCACATCAG
	Taqman Probe	
pcna (proliferating cell nuclear antigen)	Forward primer	AGAGGAGGCGGTAACCATAGAGA
	Reverse primer	GACAGTGGAGTGGCTTTTGTGA
	Taqman Probe	
irf8 (interferon regulatory factor 8)	Forward primer	CGCACACCATTCAGCCTTATCCCAG
	Reverse primer	TGGTGACTGGGTATACTGCCTATG
	Taqman Probe	TGCCCCCGTAGTAAAAGTTGA
irf5 (interferon regulatory factor 5)	Forward primer	CCTCAGCCGTACAAGATCTACGA
	Reverse primer	GTAGCATTCTCTGGAGCTCTTCCT
	Taqman Probe	CCAACGGCCCTGCTCCCACA

Table 3.　リアルタイム RT-PCR 解析用の Primer と Probe の配列

1-10　生細胞数測定法

96 ウェルプレートに適切な細胞数で BV2 細胞を播種し、各実験の培養時間ごとの生細胞数を生細胞数測定試薬 SF（nacalai tesque）を用いて測定した。測定試薬 SF を各ウェルに 10 μl ずつ添加し、3 時間後の 450 nm の吸光度を測定することで、検量線法から各細胞数を算出した。

1-11　統計処理

数値はすべて平均±標準誤差で表し、データの統計学的有意差検定は、Student’s t-test あるいは one-way ANOVA、two-way ANOVA、two-way repeated measures ANOVA による分散分析後、Bonferroni posttests による多重検定を行った。

2. 実験結果

2-1 神経障害性疼痛モデルマウスの L4 脊髄における MafB の発現量変化

マウスの L4 脊髄神経を切断することにより作製した神経障害性疼痛モデルの L4 脊髄から RNA を抽出し、Real-time PCR 法を用いて MafB の mRNA 発現量変化について検討した。その結果、神経損傷側の脊髄内における MafB mRNA 発現量が非損傷側に対して有意に増加し、その増加は、神経損傷後 3 日目から 21 日目まで持続した（Figure 10A）。

次にタンパク質レベルでの MafB 発現量変化を、MafB に対する特異的抗体を用いた免疫組織染色により確認した。その結果、神経損傷後 3 日目の脊髄後角において、非損傷側では MafB の発現が低いのに対して、損傷側ではその発現が顕著に増加することが観察された（Figure 10B）。その陽性細胞数ならびに単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度により、MafB 発現変化を定量解析したところ、非損傷側に対して損傷側で有意に MafB 発現が増加することが示された（Figure 10C, D）。

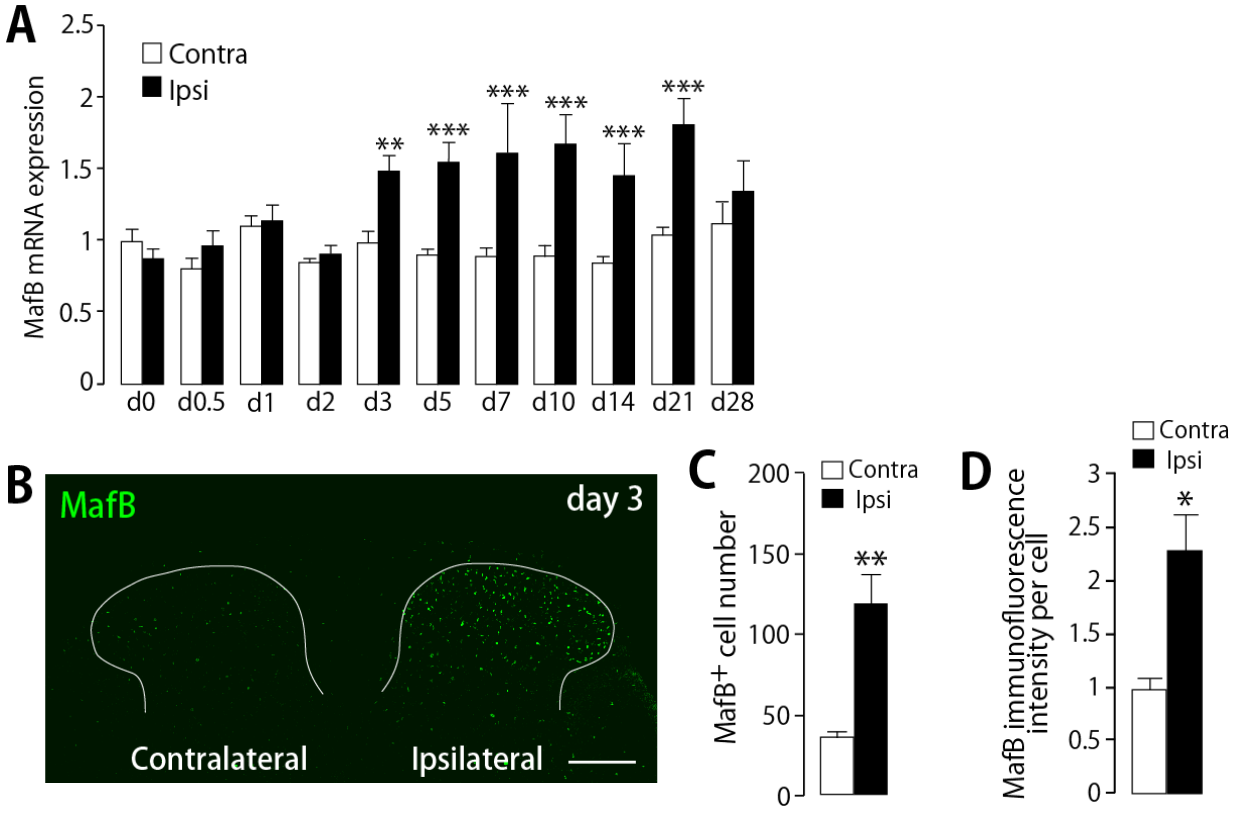


Figure 10. 末梢神経損傷後の脊髄における MafB の発現

(A) 末梢神経損傷モデルマウスの損傷側（Ipsi）および非損傷側（Contra）の L4 脊髄内における MafB mRNA 発現量の定量的リアルタイム RT-PCR 解析（n = 4-5; ***p<0.001, **p<0.01 vs Contra）。**(B, C, D)** 神経損傷後 3 日目の L4 脊髄後角における MafB の免疫組織染色画像(B)と、非損傷側および損傷側における MafB 陽性細胞数(C)と単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度(D)（Scale bar = 200 μm; n = 3; **p<0.01, *p<0.05 vs Contra）。

2-2　末梢神経損傷後の脊髄後角における MafB 発現細胞腫の特定

神経損傷側脊髄において発現増加する MafB の発現細胞腫を特定するため、神経損傷後 3 日目の L4 脊髄において、MafB に対する特異的抗体と各種細胞マーカーを用いた免疫組織二重染色を行った。その結果、非損傷側、損傷側ともに、MafB シグナルはミクログリアのマーカーである OX-42 とほぼ完全な共局在が観察され、他の細胞マーカーを用いた二重染色では共局在するものがなかった（Figure 11A-D）。別のミクログリアのマーカーである Iba1 の免疫染色結果から、脊髄後角のミクログリア細胞数を計数した（110E）。また、核染色のための DAPI を含めた三重染色の Z-stack 画像から、MafB の発現はミクログリアの核内に局在していることが観察された（Figure 11F）。

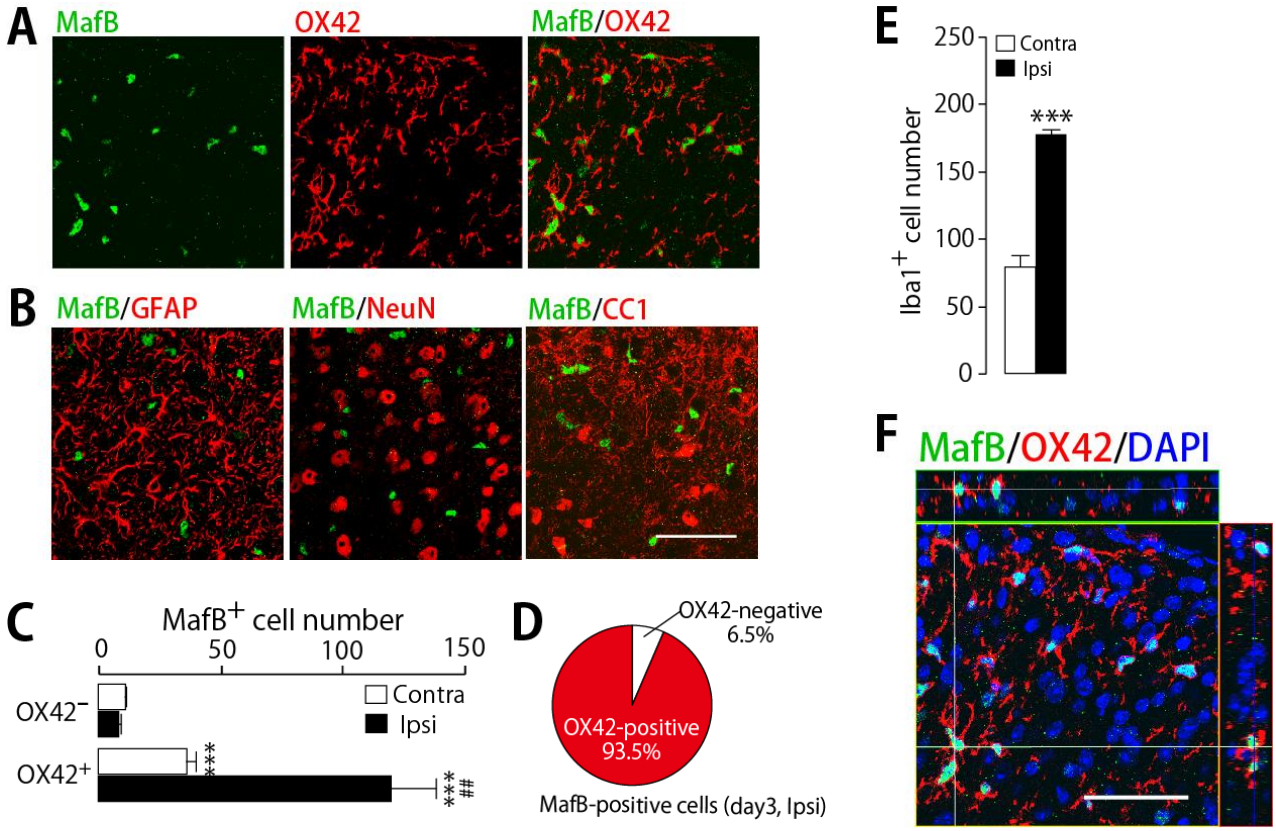
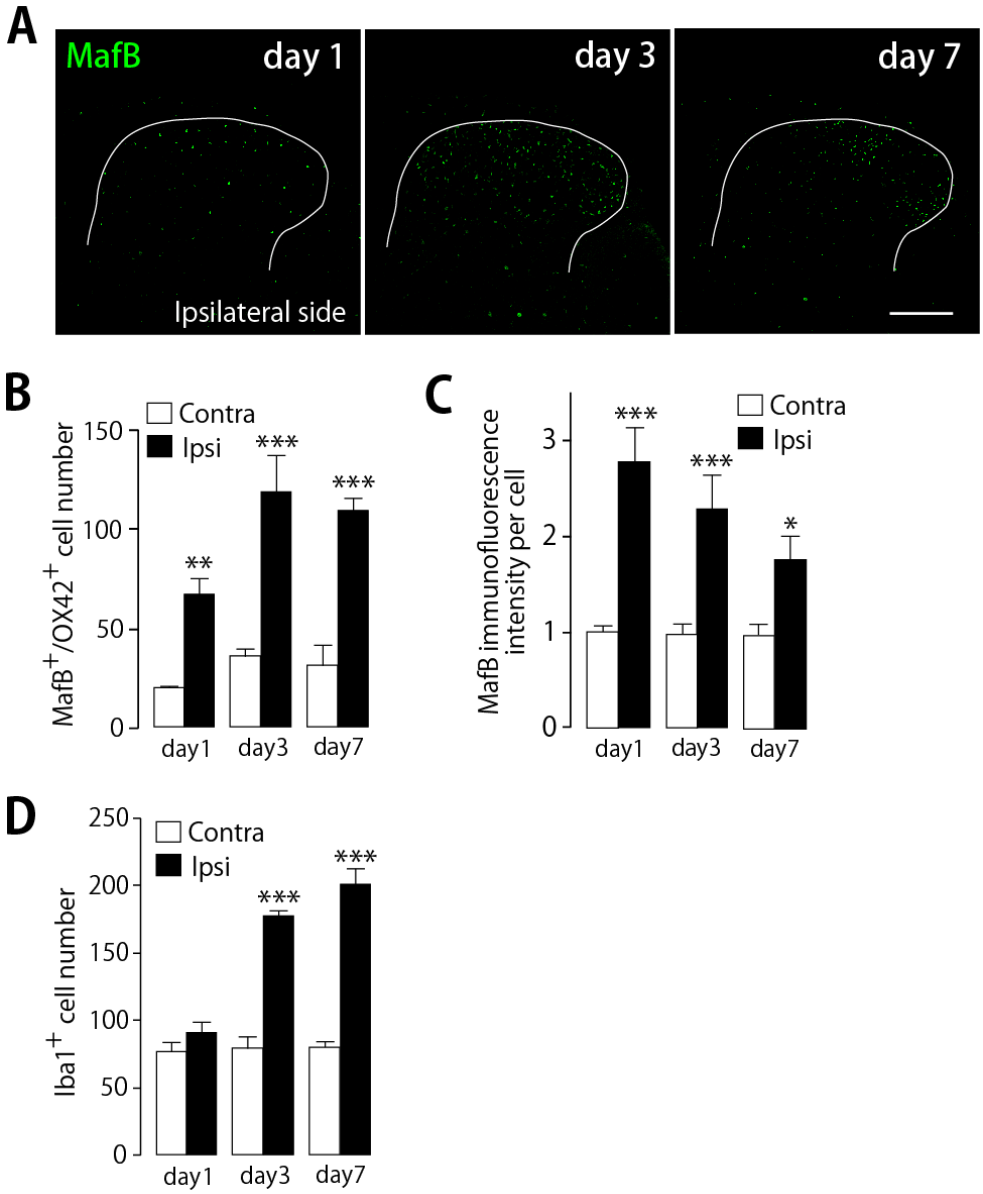


Figure 11.　脊髄後角における MafB 陽性細胞種の特定

(A, B) 神経損傷後 3 日目の損傷側 L4 脊髄後角における MafB と細胞マーカー（OX42：ミクログリア、GFAP：アストロサイト、NeuN：ニューロン、CC1：オリゴデンドロサイト）との免疫二重染色画像（Scale bar = 50 μm）。**(C)** 神経損傷後 3 日目の L4 脊髄後角における MafB 陽性細胞中の OX42 陽性細胞数および陰性細胞数（n = 3; ***p<0.001 vs $OX42^-$, $^{\#\#}$p<0.01 vs $OX42^+$ Contra）。**(D)** 神経損傷後 3 日目の損傷側 L4 脊髄後角における MafB 陽性細胞の OX42 陽性率。**(E)** 神経損傷後 3 日目の脊髄後角における Iba1 陽性細胞数（n = 3; ***p<0.001 vs Contra）。**(F)** 神経損傷後 3 日目の損傷側 L4 脊髄後角における MafB、OX42、DAPI（核染色）の免疫三重染色 Z-stack 画像（Scale bar = 50 μm）。

2-3　末梢神経損傷後の脊髄後角ミクログリアでの経時的 MafB 発現変化

神経損傷側の L4 脊髄後角ミクログリアで特異的に発現増加する MafB の経時的発現変化を検討した。神経損傷後 1、3、7 日目の L4 脊髄において、MafB と OX-42 の免疫二重染色を行ったところ、すべてのタイムポイントで MafB 発現の増加が観察され、その陽性細胞はミクログリアであることが確認された（Figure 12A）。MafB と OX-42 の共陽性細胞数は、神経損傷後 1 日目から顕著に増加し、3 日目から 7 日目でピークを示した（Figure 12B）。また、単一陽性細胞あたりの MafB 免疫染色強度は、神経損傷後 1 日目をピークに顕著な増加を示し、7 日目においても有意な増加を示した（Figure 12C）。ミクログリアのマーカーである Iba1 の免疫染色の結果から、ミクログリア細胞数は神経損傷後 3 日目から有意に増加した（Figure 12D）。ヒストグラム分布から、非損傷側に対して損傷側において、MafB 高発現ミクログリアの細胞数分布の増加が確認された（Figure 12E）。



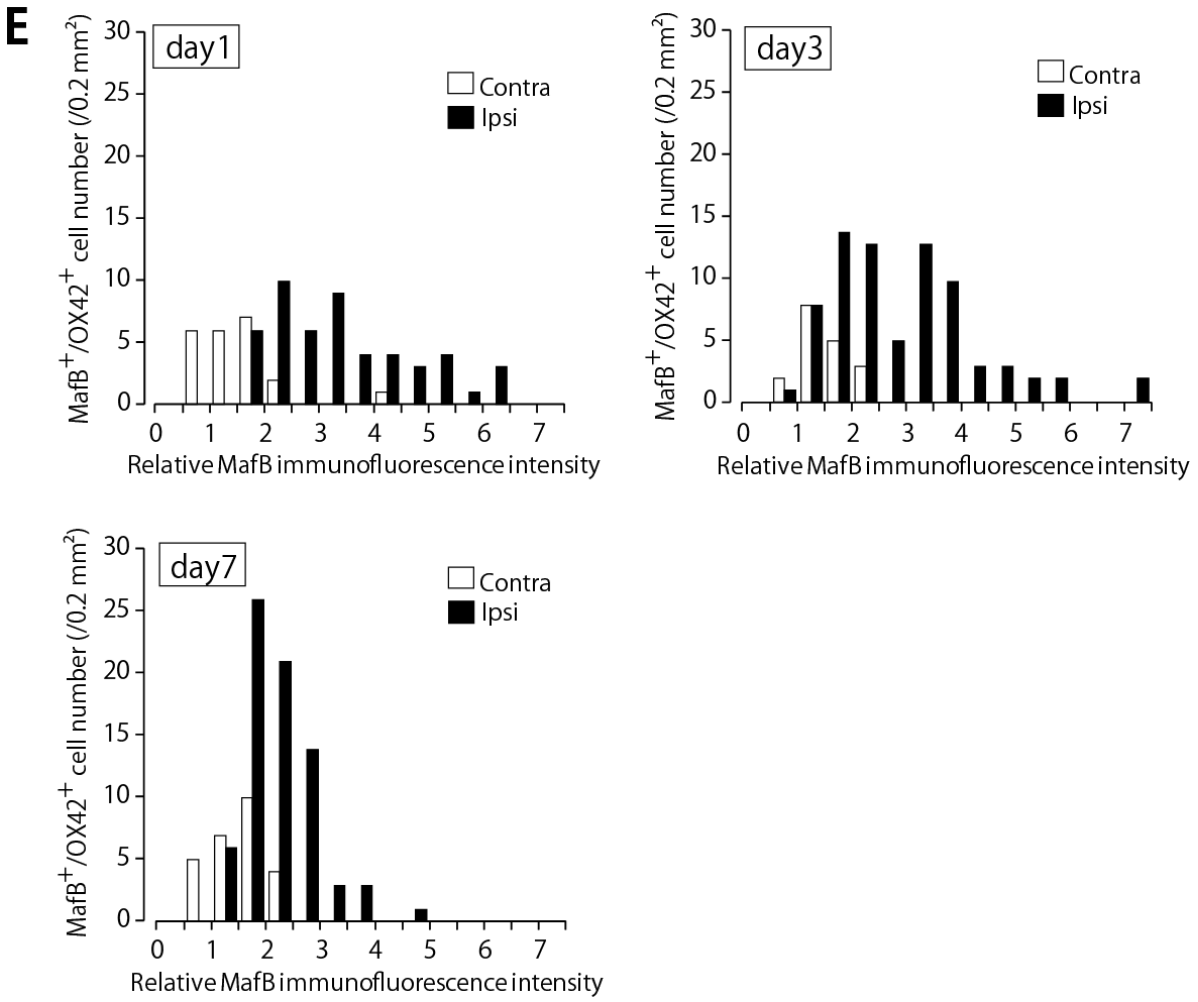


Figure 12.　末梢神経損傷後の MafB 陽性ミクログリア細胞数の変化

(A) 神経損傷後 1、3、7 日目の損傷側 L4 脊髄後角における MafB 免疫染色画像（Scale bar = 200 μm）。**(B, C)** 神経損傷後の非損傷側および損傷側 L4 脊髄後角における MafB/OX42 共陽性細胞数(B)と、単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度(C)（n = 3-4; ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 vs Contra）。**(D)** 神経損傷後の非損傷側および損傷側 L4 脊髄後角における Iba1 陽性細胞数（n = 3; ***p<0.001 vs Contra）。**(E)** 神経損傷後 1、3、7 日目の非損傷側および損傷側 L4 脊髄後角内における MafB 免疫蛍光強度と陽性細胞数のヒストグラム分布。相対強度は非損傷側の MafB 蛍光強度平均値に対する相対値として算出した。

2-4　末梢神経損傷後の脊髄後角における MafB 陽性ミクログリアの増殖活性

神経損傷後に MafB を発現するようになるミクログリアの性質として、まず増殖期マーカーである EdU を用いてその増殖性を検討した。神経損傷後 12 時間、24 時間、48 時間での L4 脊髄において、MafB と EdU の二重染色を行ったところ、損傷側脊髄後角において MafB 陽性細胞数は Iba1 陽性細胞数の増加に先立つ損傷 24 時間後から有意に増加し（Figure 12D）、EdU 陽性細胞数は損傷 48 時間後から有意に増加した（Figure 13A, B）。MafB 陽性細胞数の増加が EdU 陽性細胞数の増加に先立って起こり、また EdU 陽性細胞のほとんどが MafB 共陽性であることが観察された（Figure 13B-D）。非損傷側脊髄後角では MafB 陽性細胞数、EdU 陽性細胞数ともに変化はなかった。

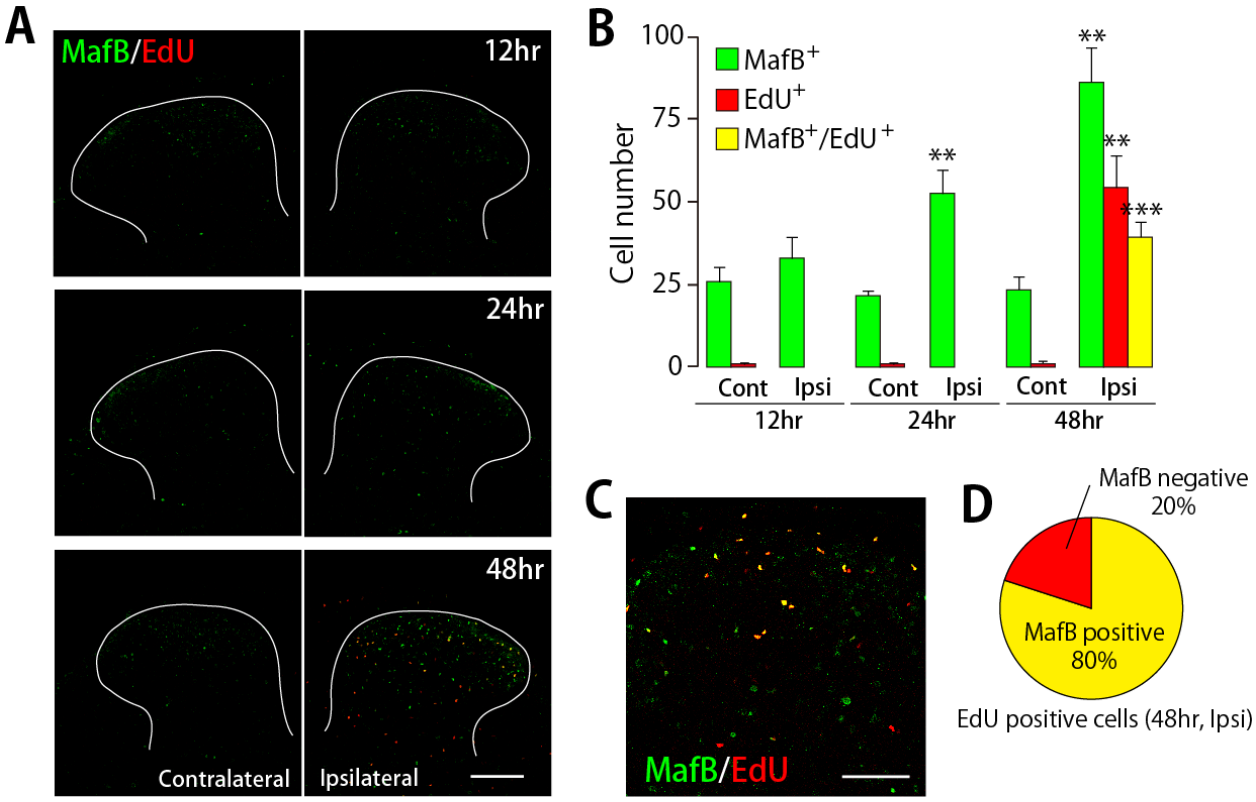


Figure 13.　末梢神経損傷後の脊髄後角 MafB 陽性細胞の増殖活性

(A) 神経損傷後 12、24、48 時間での L4 脊髄後角における MafB と EdU との二重染色画像（Scale bar = 200 μm）。**(B)** 神経損傷後の非損傷側および損傷側 L4 脊髄後角における MafB 陽性細胞数、EdU 陽性細胞数、MafB/EdU 共陽性細胞数変化（n = 3-4; ***p<0.001, **p<0.01 vs Cont）。**(C)** 神経損傷後 48 時間での損傷側 L4 脊髄後角における MafB と EdU の二重染色拡大画像（Scale bar = 50 μm）。**(D)** 神経損傷後 48 時間での損傷側 L4 脊髄後角における EdU 陽性細胞の MafB 陽性率。

2-5　末梢神経損傷後の脊髄後角における MafB 陽性ミクログリアの活性化表現型

次に、マクロファージ等の貪食細胞マーカーおよびミクログリアの活性化マーカーとして用いられる表面抗原 CD68 の発現を免疫組織染色により観察することで、MafB 陽性ミクログリアにおける発現分子の変化を検討した。その結果、神経損傷後 7 日目の脊髄後角において、損傷側で CD68 の染色が増加し、また非損傷側および損傷側の双方における CD68 陽性細胞はすべて MafB 共陽性であることが観察された（Figure 14）。

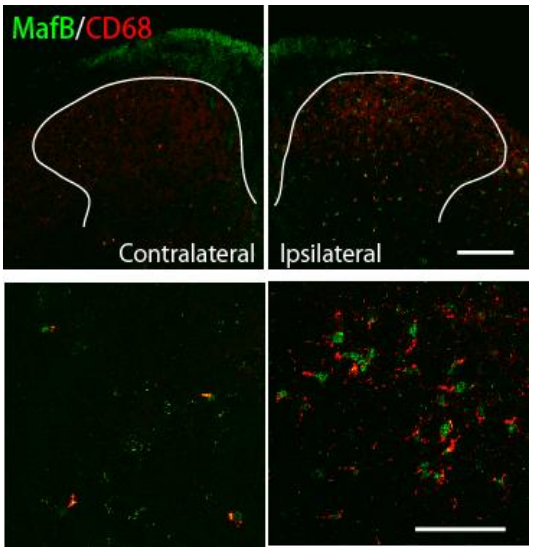
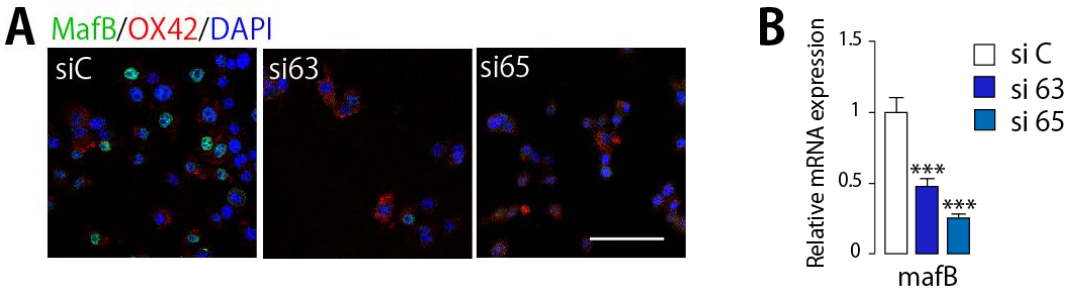


Figure 14.　末梢神経損傷後の脊髄後角 MafB 陽性細胞における活性化マーカーの発現
神経損傷後 7 日目の脊髄後角における MafB と CD68 との免疫二重染色画像（Scale bar = 200 μm）。

2-6　MafB 標的 siRNA 処置によるミクログリア細胞での遺伝子発現変化

ミクログリアに発現する MafB の転写因子としての機能を検討するため、BV2 細胞を用いて、MafB 標的 siRNA 処置による MafB ノックダウン後の遺伝子発現変化を解析した。まず MafB 標的 siRNA 処置 48 時間後、MafB のタンパク質発現レベルの変化を免疫染色により確認したところ、コントロールの siRNA（siC）と比較して MafB 標的 siRNA（si63、si65）を処置した BV2 細胞で MafB 発現の顕著な抑制が観察された（Figure 15A）。同様に、リアルタイム RT-PCR 法により、MafB の mRNA 発現レベルにおいても有意な発現抑制が確認された（Figure 15B）。さらに、ミクログリアの主要な機能分子であり、神経障害性疼痛との関連も報告されている様々な遺伝子群（ATP 受容体、Toll 様受容体、炎症性サイトカイン、カテプシン S）や細胞周期関連遺伝子（cyclinD2、PCNA）、ミクログリアのマーカータンパク質 Iba1、および近年ミクログリアの主要な機能制御因子として同定されている IRF8、IRF5 の発現変化を MafB ノックダウン細胞で検討した。その結果、いずれの遺伝子においてもその mRNA 発現の有意な抑制あるいは抑制傾向が見られた（Figure 15C）。



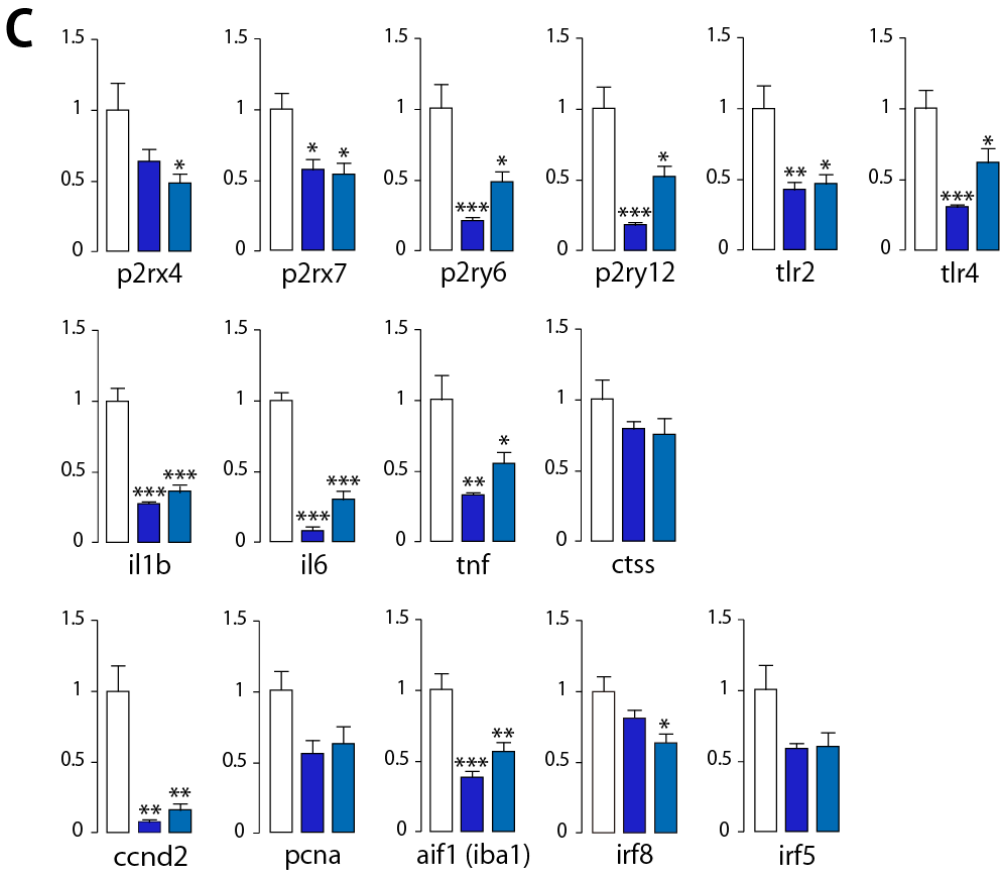


Figure 15.　BV2 細胞における siRNA 処置による MafB ノックダウンと遺伝子発現変化

(A) MafB 標的 siRNA 処置 48 時間後 の BV2 細胞における MafB、OX42、DAPI の免疫三重染色画像（Scale bar = 50 μm）。**(B, C)** MafB 標的 siRNA 処置 48 時間後 の BV2 細胞における MafB(B)および他の疼痛関連遺伝子(C)の mRNA 発現量の定量的リアルタイム RT-PCR 解析（n = 5; ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 vs siC）。

2-7　MafB 標的 shRNA 発現ウイルス処置によるミクログリア細胞での遺伝子発現変化

ミクログリア細胞での MafB ノックダウンによる遺伝子発現変化を、さらに shRNA を発現するウイルスベクターを用いた系で確認した。MafB 標的 shRNA の安定発現 BV2 細胞における MafB タンパク質発現レベルを免疫染色により確認したところ、MafB 発現の低下が観察された（Figure 16A）。タイターをそろえたコントロールのウイルスベクター（shC）および MafB 標的 shRNA 発現ウイルスベクター（sh6、sh21）を BV2 細胞に処置し、72 時間後の mRNA 発現変化をリアルタイム RT-PCR 法により定量解析した結果、MafB mRNA に有意な発現抑制が示された（Figure 16B）。さらに、MafB ノックダウンによる他の疼痛関連遺伝子群の mRNA 発現変化を解析した結果、siRNA 処置時と同様にそれぞれ mRNA 発現量の有意な抑制あるいは抑制傾向が見られた（Figure 16C）。

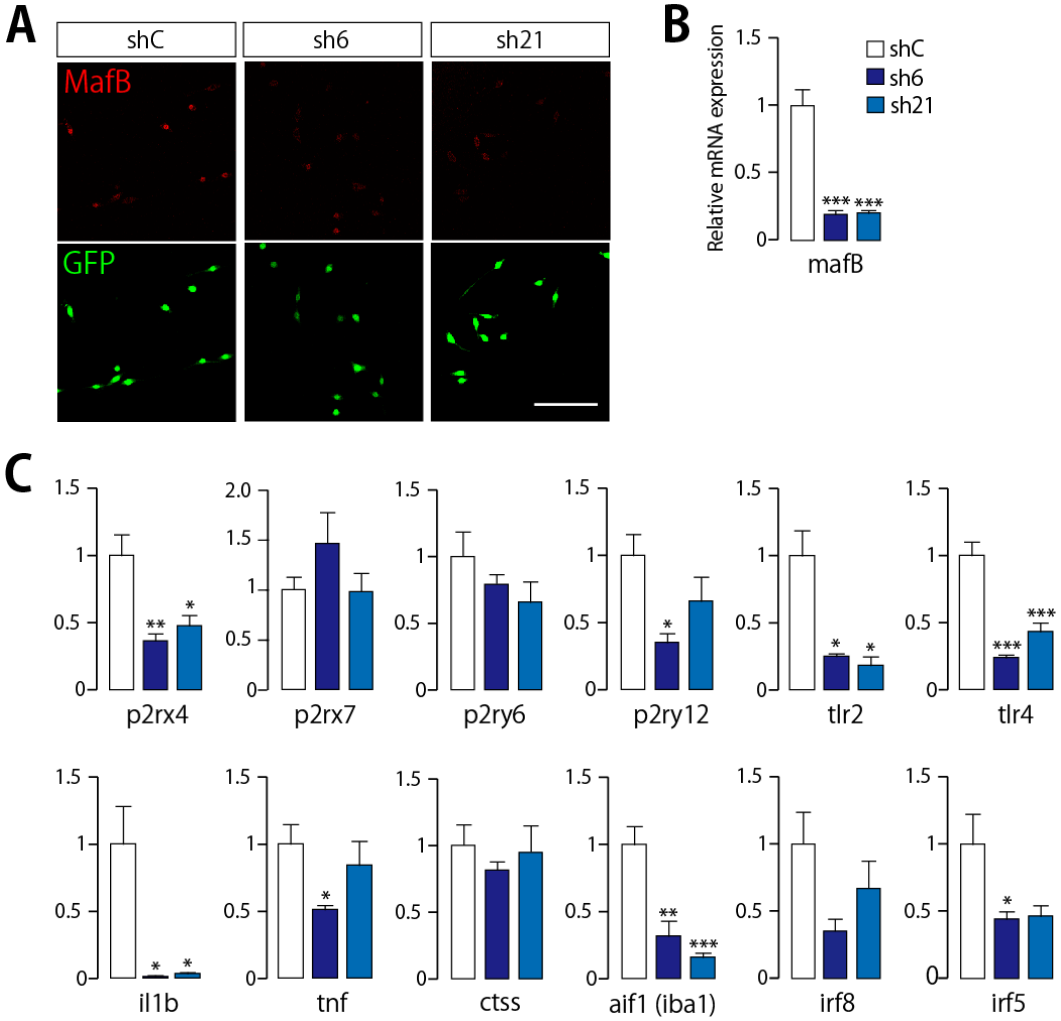


Figure 16.　BV2 細胞における shRNA 発現レンチウイルスベクター処置による MafB ノックダウンと遺伝子発現変化

(A) MafB 標的 shRNA 安定発現 BV2 細胞における MafB と GFP の染色画像（Scale bar = 50 μm）。**(B, C)** MafB 標的 shRNA 発現ウイルスベクター処置 72 時間後の BV2 細胞における MafB(B)および他の疼痛関連遺伝子(C)の mRNA 発現量の定量的リアルタイム RT-PCR 解析（n = 5; ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 vs shC）。

2-8　MafB ノックダウンミクログリア細胞の LPS 応答性変化

MafB 発現をノックダウンさせたミクログリアにおける炎症刺激応答性変化を検討した。MafB 標的 siRNA を 48 時間処置することで MafB をノックダウンさせた BV2 細胞に、炎症刺激として LPS 100 ng/ml 処置を行った。LPS 刺激 3 時間後における炎症性サイトカイン IL-1β、IL-6、TNF-αの mRNA 発現変化をリアルタイム RT-PCR 法により定量解析した結果、いずれも LPS 刺激によって顕著な発現増加を示し、また siC 処置細胞に対して si63、si65 処置細胞ではその IL-1β、IL-6 の発現増加が有意に抑制された（Figure 17）。

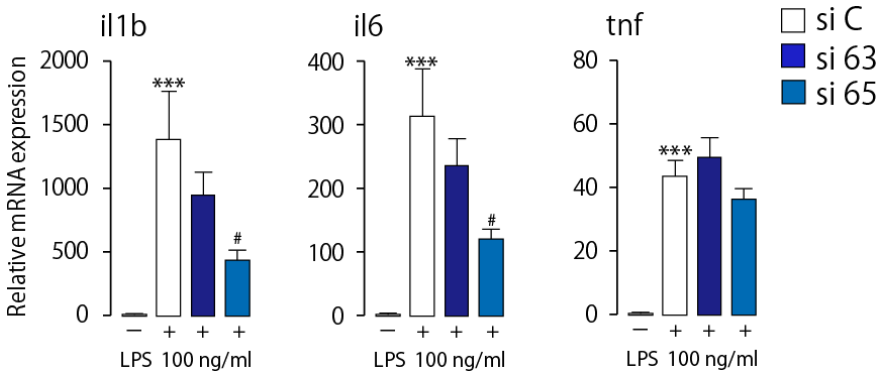


Figure 17.　MafB をノックダウンした BV2 細胞における LPS 応答性遺伝子発現変化
MafB 標的 siRNA 処置 48 時間後の BV2 細胞に LPS（100 ng/ml）を 3 時間刺激した後の、炎症性サイトカイン IL-1β、IL-6、TNF-αの mRNA 発現量の定量的リアルタイム RT-PCR 解析（n = 5; ***$p<0.001$ vs LPS- siC; $^{\#}p<0.05$ vs LPS+ siC）。

2-9　MafB ノックダウンミクログリア細胞の細胞増殖能変化

MafB がミクログリアの細胞増殖能に及ぼす役割を検討するため、通常高い増殖能を有する BV2 細胞において MafB をノックダウンさせた後の細胞増殖能を解析した。MafB 標的 siRNA を 48 時間処置した BV2 細胞を、同一細胞数で播種してから 24、48、72 時間後の生細胞数を測定した結果、si63 および si65 処置細胞では siC 処置細胞に比較して有意な細胞増殖抑制が見られた（Figure 18A, B）。また、同様の検討を MafB 標的 shRNA の安定発現 BV2 細胞で行ったところ、同様の結果が得られた（Figure 18C, D）。

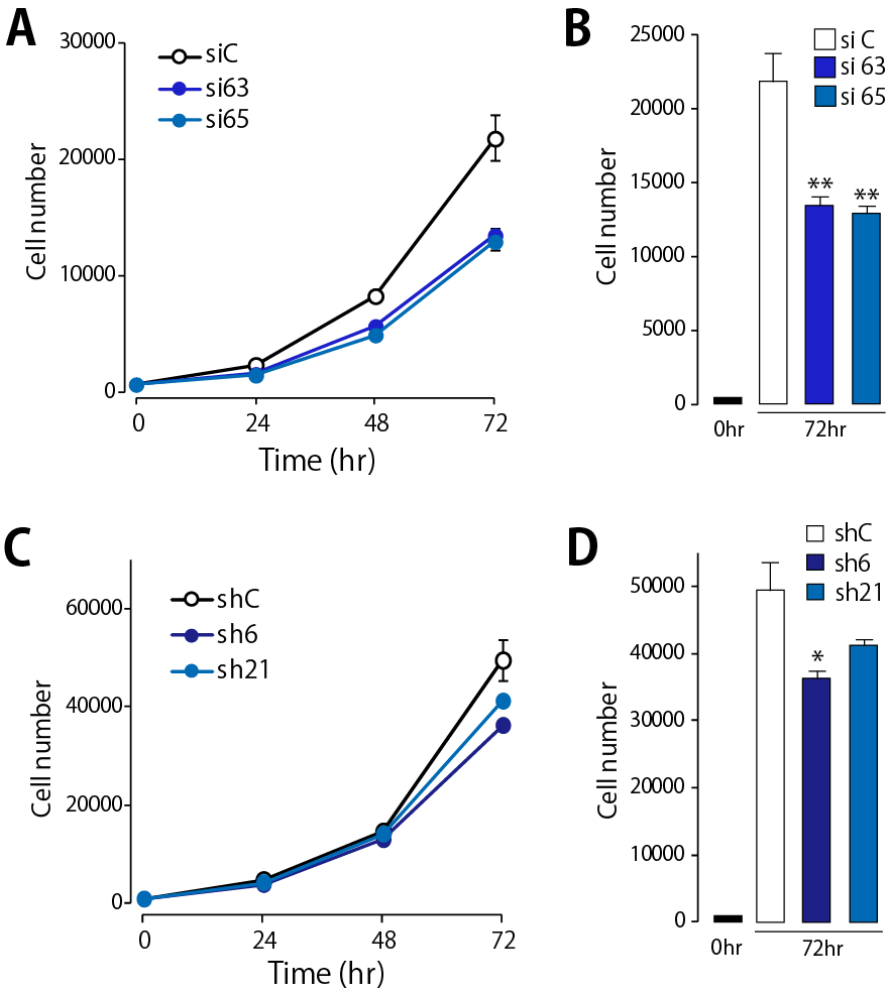


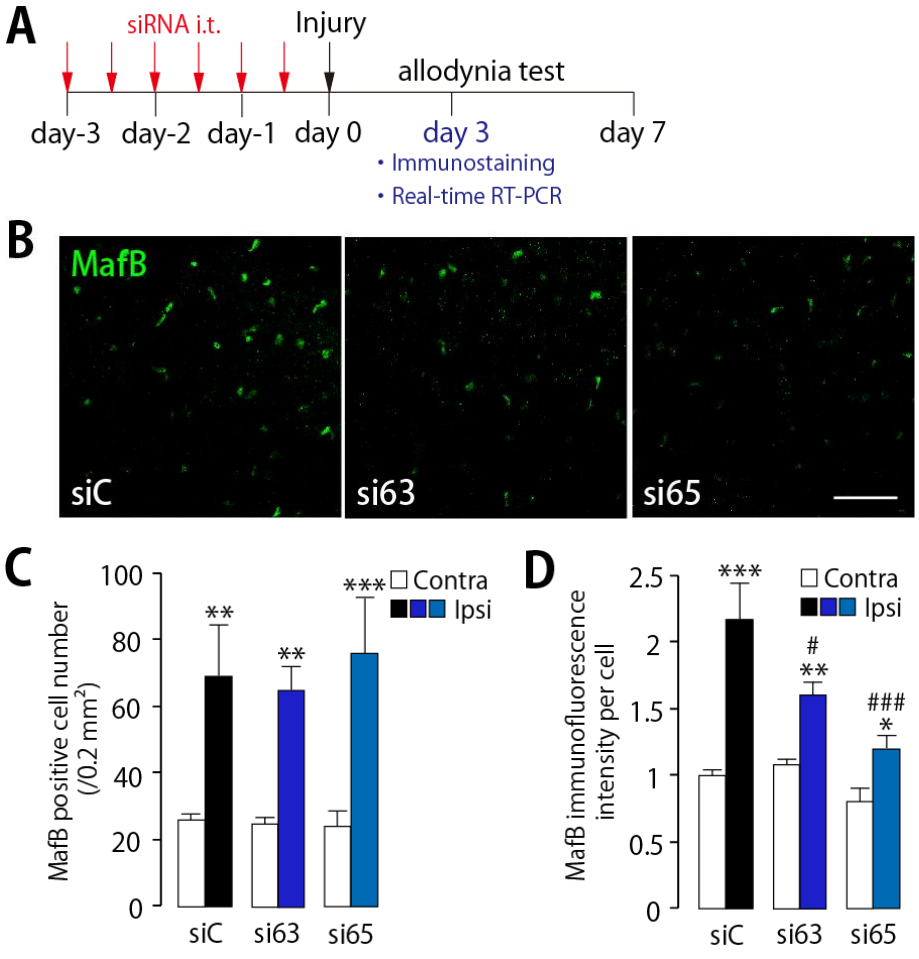
Figure 18.　MafB をノックダウンした BV2 細胞における細胞増殖能変化

(A, B) MafB 標的 siRNA 処置 48 時間後の BV2 細胞を、細胞数 500 で播種し、24、48、72 時間後での経時的細胞数変化（n = 3; **p<0.01 vs siC）。**(C, D)** MafB 標的 shRNA 安定発現系 BV2 細胞を、細胞数 1000 で播種し、24、48、72 時間後での経時的細胞数変化（n = 4; *p<0.05 vs shC）。

2-10　MafB 標的 siRNA 投与による神経損傷後のアロディニア行動変化

末梢神経損傷後の脊髄後角ミクログリアで発現増加する MafB が、疼痛関連遺伝子の発現制御を介して実際にアロディニア行動に寄与しているかを、マウスの脊髄腔内に siRNA を前投与することにより検討した。siRNA の投与は神経損傷の 3 日前から 1 日 2 回、3 日間行い、その後、アロディニア行動を測定した（Figure 19A）。まず、siRNA 投与による MafB 発現のノックダウン効率を、MafB 免疫染色により確認した。その結果、siRNA 投与マウスの神経損傷後 3 日目の L4 脊髄後角において、コントロールの siRNA 投与群（siC）に見られるような顕著な MafB 発現増加が、2 種類の MafB 標的 siRNA 投与群（si63、si65）ではその発現が顕著に抑制されている様子が観察された（Figure 19B）。定量解析の結果、MafB 標的 siRNA 投与により MafB 陽性細胞数には変化が見られなかったが、単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度が有意に抑制されていた（Figure 19C, D）。そのような siRNA 投与マウスを用いて、実際にアロディニア行動を解析したところ、非損傷側に変化は見られなかったが、一方、損傷側においては、siC 投与群に見られる強い後肢逃避閾値の低下に対して、si63 および si65 投与群では有意な抑制が認められた（Figure 19E）。

また、発症後のアロディニアに対する MafB の関与を検討するため、神経損傷後 7 日目から siRNA を 1 日 2 回、3 日間、マウスの脊髄腔内に投与し、アロディニア行動を測定した（Figure 19F）。その結果、神経損傷後 7 日目において低下した後肢逃避閾値は、siC 投与群と同様に si63 および si65 投与群においても有意な回復を示さなかった（Figure 19G）。



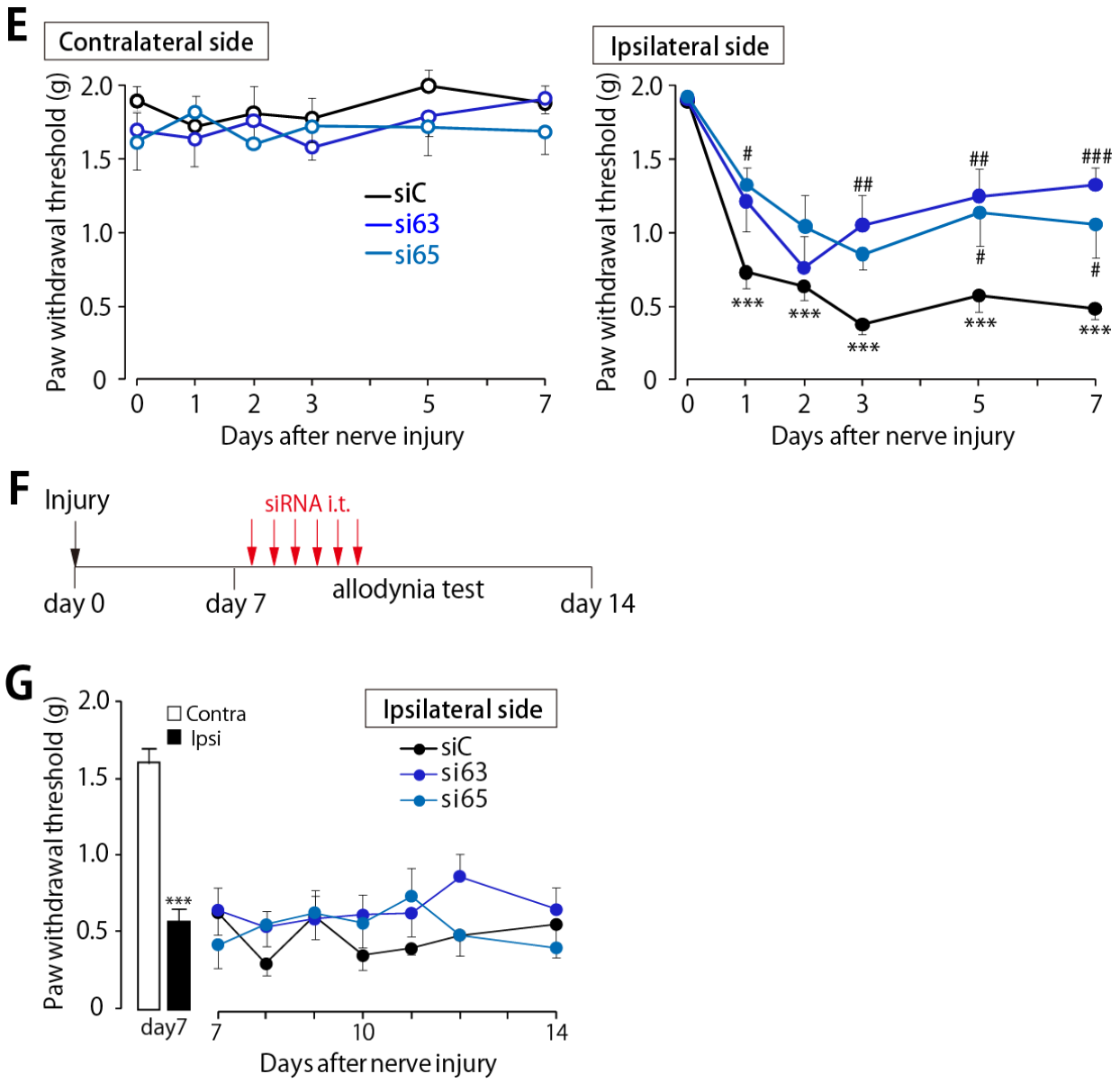


Figure 19.　MafB 標的 siRNA の脊髄腔内投与による末梢神経損傷後の脊髄後角内 MafB 発現変化とアロディニア行動変化

(A) 神経損傷 3 日前から 1 日 2 回、3 日間、MafB 標的 siRNA をマウス脊髄腔内に投与（20 pmol/回）。**(B, C, D)** MafB 標的 siRNA 投与マウスの神経損傷後 3 日目の損傷側 L4 脊髄後角における MafB 免疫染色画像(B)と、その MafB/OX42 共陽性細胞数(C)および単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度(D)（Scale bar = 50 μm; n = 3; ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 vs Contra; $^{###}$p<0.001, $^{#}$p <0.05 vs siC Ipsi）。**(E)** MafB 標的 siRNA 前投与マウスにおける、神経損傷後の軽度機械刺激に対する非損傷側および損傷側での後肢逃避閾値の変化（n = 6; ***p<0.001 vs Contralateral side; $^{###}$p<0.001, $^{##}$p<0.01, $^{#}$p<0.05 vs Ipsilateral side of siC）。**(F)** 神経損傷後 7 日目から 1 日 2 回、3 日間、MafB 標的 siRNA をマウス脊髄腔内に投与（20 pmol/回）。**(G)** 神経損傷後 7 日目から MafB 標的 siRNA を投与したマウスにおける、軽度機械刺激に対する損傷側での後肢逃避閾値の変化（n = 4; ***p<0.001 vs Contra）。

2-11　MafB 標的 siRNA 投与による神経損傷後の脊髄内遺伝子発現変化

MafB 標的 siRNA 投与により、アロディニア行動が緩解されたので、そのときの脊髄内における疼痛関連遺伝子群の mRNA 発現変化をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。まず神経損傷後 3 日目の L4 脊髄における MafB mRNA 発現は、MafB 標的 siRNA 投与により抑制傾向が見られた（Figure 20A）。続いて、BV2 細胞での検討と同様に、ミクログリアの主要な機能分子であり、神経障害性疼痛との関連も報告されている様々な遺伝子群（ATP 受容体、Toll 様受容体、炎症性サイトカイン、カテプシン S）、ミクログリアのマーカータンパク質 Iba1、および近年ミクログリアの主要な機能制御因子として同定されている IRF8、IRF5 について、その mRNA 発現量を定量解析した。その結果、いずれの遺伝子においても発現抑制傾向が見られ、特に ATP 受容体および Toll-like receptor 2（TLR2）の発現が顕著に抑制されていた（Figure 20B）。

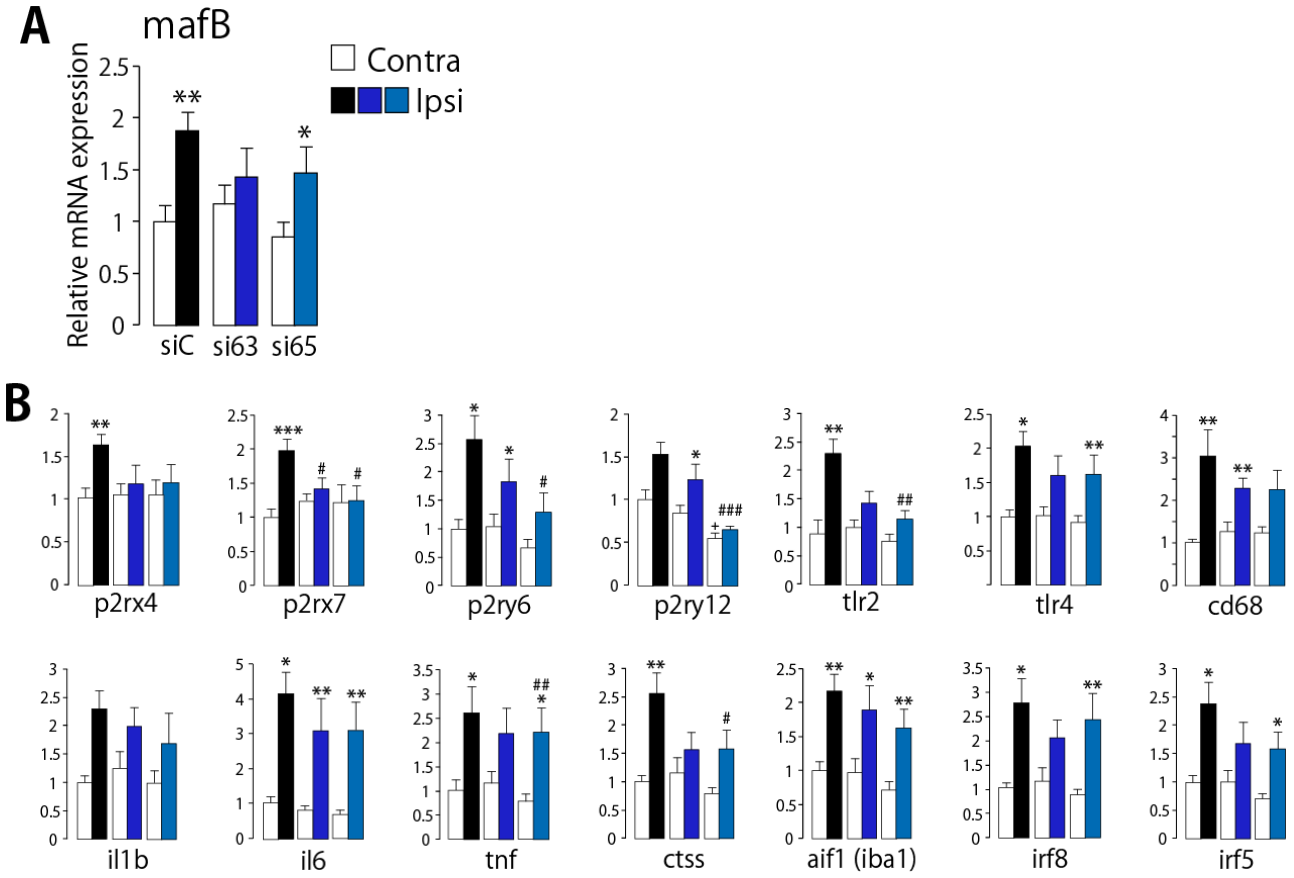


Figure 20.　MafB 標的 siRNA の脊髄腔内投与による末梢神経損傷後の脊髄内遺伝子発現変化
(A, B) MafB 標的 siRNA 投与マウスの神経損傷後 3 日目の非損傷側および損傷側 L4 脊髄内における MafB(A)および他の疼痛関連遺伝子(B)の mRNA 発現量の定量的リアルタイム RT-PCR 解析（n = 8-9; ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 vs Contra; $^{###}$p<0.001, $^{##}$p<0.01, $^{#}$p<0.05 vs siC Ipsi; $^{+}$p<0.05 vs siC Contra）。

2-12　MafB 標的 siRNA 投与による神経損傷後の脊髄後角ミクログリア細胞数変化

神経損傷後の MafB 陽性細胞が増殖期マーカーEdU を高発現すること、および BV2 細胞において MafB が細胞増殖能を制御することが示唆されたので、神経損傷後の脊髄後角におけるミクログリアの細胞増殖が、MafB 標的 siRNA 投与によって変化するかを検討した。siRNA 投与マウスの神経損傷後 3 日目の L4 脊髄において、ミクログリアのマーカータンパク質である Iba1 を免疫染色により観察したところ、siC 投与群に見られる細胞数増加および細胞体の肥大化といった形態的変化は、si63、si65 投与群においても観察された（Figure 21A）。その L4 脊髄後角における Iba1 陽性細胞数を計数した結果、MafB 標的 siRNA 投与によって細胞数に有意な抑制は認められなかった（Figure 21B）。

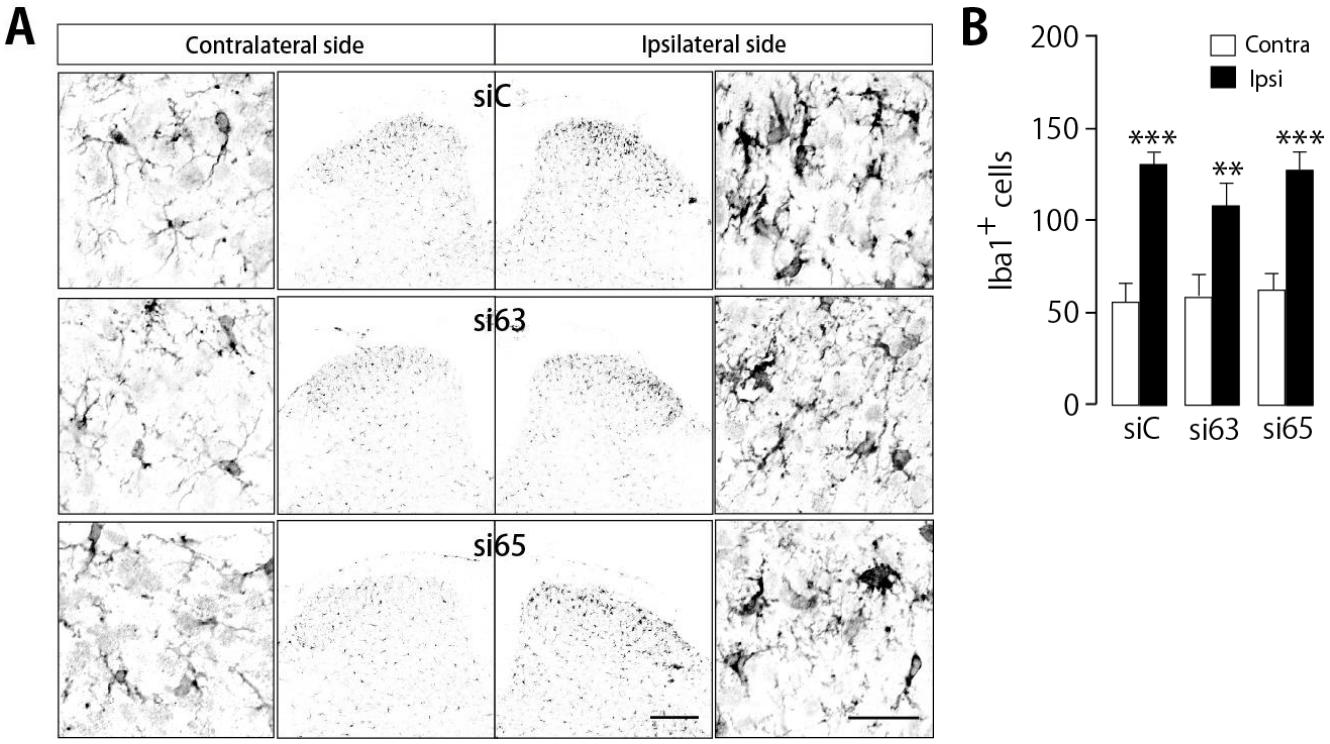


Figure 21.　MafB 標的 siRNA の脊髄腔内投与による末梢神経損傷後の脊髄後角内ミクログリアの細胞数および形態変化

(A, B) MafB 標的 siRNA 投与マウスの神経損傷後 3 日目の非損傷側および損傷側 L4 脊髄後角における Iba1 免疫染色画像(A)と、Iba1 陽性細胞数(B)（Scale bar = 200 μm, 50 μm; n = 3; ***p<0.001, **p<0.01 vs Contra）

2-13　P2X4 受容体欠損マウスにおける神経損傷後の脊髄内 MafB 発現変化

末梢神経損傷後に脊髄後角ミクログリアでの MafB 発現を誘導する因子を探索するため、過去に神経障害性疼痛での重要性が報告された ATP-P2X4 受容体シグナルについて検討した(Tsuda et al., 2003; Coull et al., 2005)。野生型マウス（wt マウス）および P2X4 受容体欠損マウス（p2rx4ko マウス）での神経損傷後 3 日目の L4 脊髄において MafB 免疫組織染色を行った結果、wt マウスと p2rx4ko マウスとの間には、神経損傷側で増加する MafB 陽性ミクログリア細胞数および MafB 免疫蛍光強度に有意な差異は認められなかった（Figure 22A-C）。

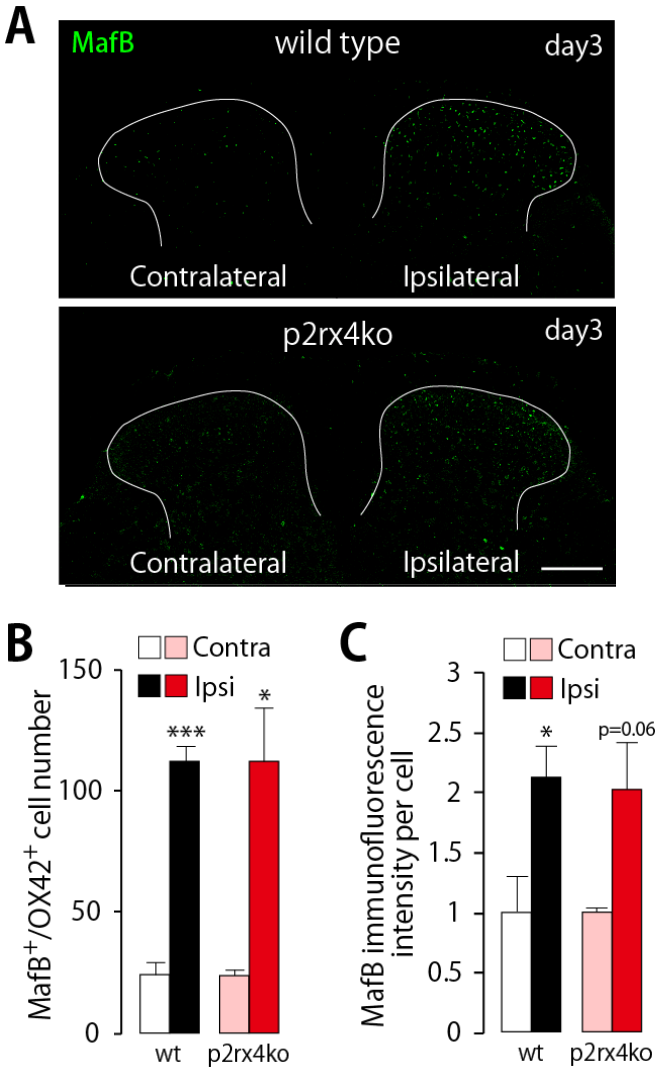


Figure 22.　p2rx4ko マウスにおける末梢神経損傷後の脊髄後角ミクログリアでの MafB 発現変化
(A) wt マウスおよび p2rx4ko マウスの神経損傷後 3 日目の非損傷側および損傷側 L4 脊髄後角における MafB 免疫染色画像（Scale bar = 200 μm）。**(B, C)** wt マウスおよび p2rx4ko マウスにおける神経損傷後 3 日目の MafB/OX42 共陽性細胞数(B)と単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度(C)（n = 3; ***p<0.001, *p<0.05 vs Contra）。

2-14　CCL21 処置によるミクログリア細胞での MafB 発現変化

MafB 発現誘導因子として、過去に神経損傷後早期に後根神経節（DRG）および脊髄後角内で発現増加し、ミクログリアに作用することが報告されているケモカイン CCL21 について検討した(Biber et al., 2011)。まず、初代培養ミクログリア細胞に CCL21（10 ng/ml）を処置し、経時的な MafB 発現変化を免疫細胞染色により確認した。その結果、初代培養ミクログリア細胞はすべて MafB 陽性であることが確認され、さらに PBS 群に比較して CCL21 群において、処置 6 時間後から有意な MafB 免疫蛍光強度の増加が認められた（Figure 23A, B）。

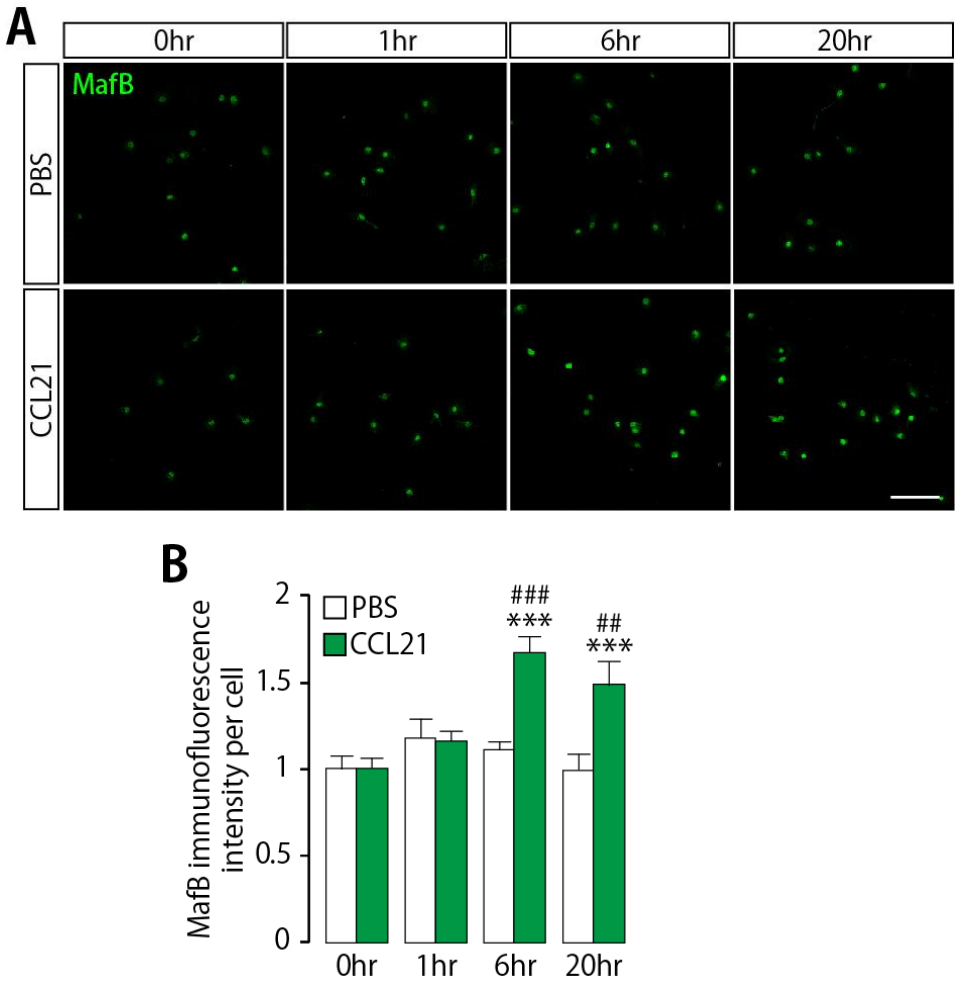


Figure 23.　CCL21 処置による初代培養ミクログリア細胞での経時的 MafB 発現変化

(A, B) 初代培養ミクログリア細胞における CCL21 処置後 0、1、6、20 時間での MafB 免疫染色画像(A)と、単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度(B)（Scale bar = 50 μm; n = 5; ***p<0.001, **p<0.01 vs PBS; $^{###}$p<0.001, $^{##}$p<0.01 vs 0 hr）。

2-15　CCL21 投与による脊髄後角ミクログリアでの MafB 発現変化

培養ミクログリア細胞で CCL21 刺激による MafB 発現増加が観察されたので、CCL21 の脊髄腔内投与による脊髄後角ミクログリアでの MafB 発現変化を検討した。マウスの脊髄腔内に CCL21 （60 ng/mouse）を単回投与し、6 時間後および 20 時間後に MafB 免疫組織染色を行った。その結果、PBS 投与群に対して CCL21 投与群において脊髄後角での MafB 染色の増加が観察され（Figure 24A）、定量解析により MafB 陽性細胞数に有意な増加が認められ、単一陽性細胞あたりの免疫蛍光強度には増加傾向が見られた（Figure 24B, C）。ヒストグラム分布から、CCL21 の投与によってミクログリアの細胞数分布が MafB 高発現側にシフトすることが確認された（Figure 24D）。

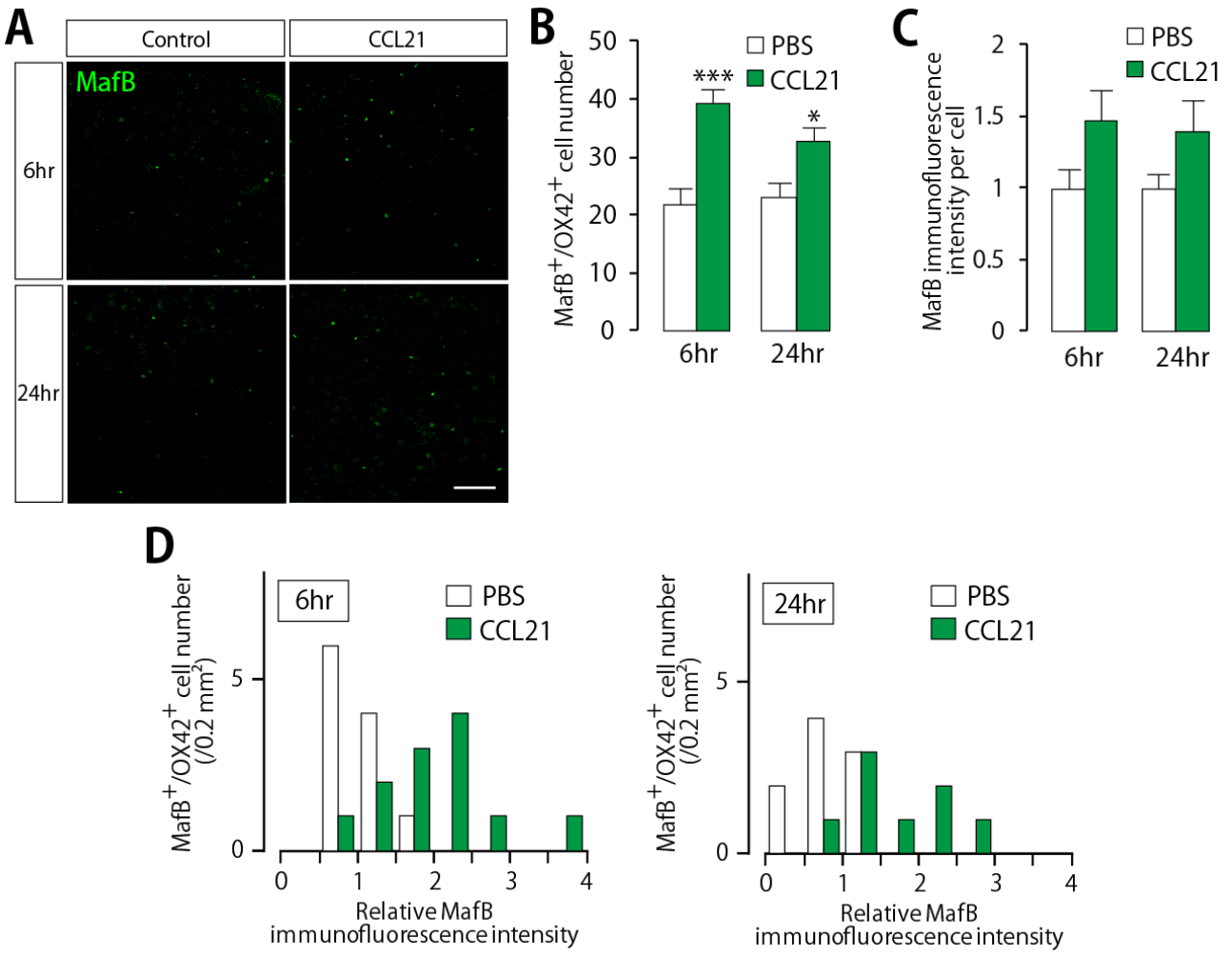
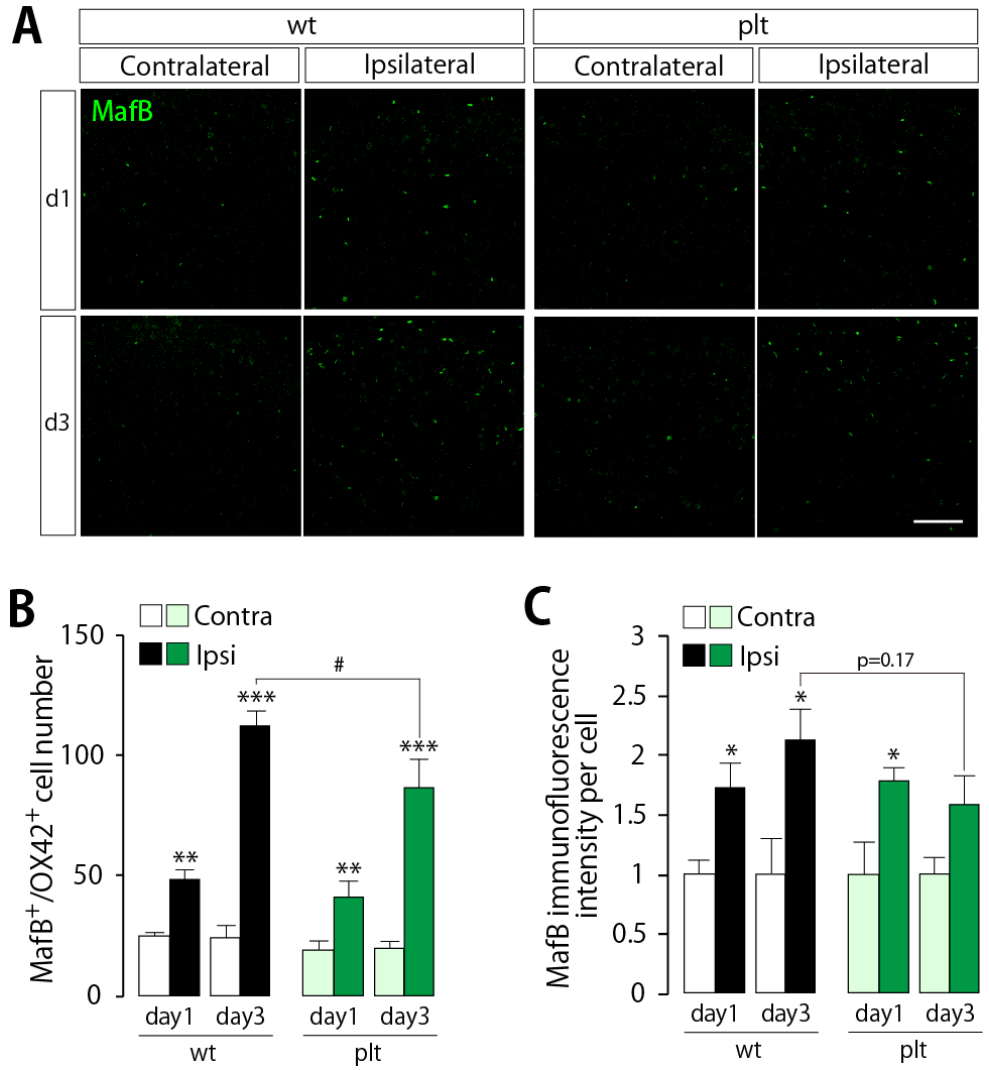


Figure 24.　CCL21 脊髄腔内投与による脊髄後角ミクログリアでの MafB 発現変化

(A) CCL21（60 ng/mouse）単回脊髄腔内投与後 6、24 時間での L4 脊髄後角における MafB 免疫染色画像（Scale bar = 50 μm）。**(B, C)** CCL21 脊髄腔内投与後 6、24 時間での L4 脊髄後角における MafB/OX42 共陽性細胞数(B)と単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度(C)（n = 4-5; ***p<0.001, *p<0.05 vs PBS）。**(D)** CCL21 の単回脊髄腔内投与後 6 時間、24 時間での L4 脊髄後角内における MafB 免疫蛍光強度と陽性細胞数のヒストグラム分布。相対強度は PBS 群の MafB 蛍光強度平均値に対する相対値として算出した。

2-16　CCL21 欠損マウスにおける神経損傷後の脊髄内 MafB 発現変化

神経損傷後の脊髄後角ミクログリアにおける MafB 発現増加に CCL21 が関与するかどうかを、CCL21 欠損マウス（plt マウス）を用いて検討した。野生型マウス（wt マウス）および plt マウスでの神経損傷後 1 日目、3 日目の L4 脊髄において、MafB 免疫組織染色を行ったところ、wt マウスに対して plt マウスで MafB 染色の減少が観察された（Figure 25A）。それを定量した結果、plt マウスでは神経損傷側で増加する MafB 陽性細胞数および単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度に抑制傾向が認められた（Figure 25B, C）。ヒストグラム分布から、wt マウスに対して plt マウスでは、神経損傷後 3 日目の損傷側脊髄後角におけるミクログリアの細胞数分布が MafB 低発現側へとシフトする傾向が確認された（Figure 25D）。



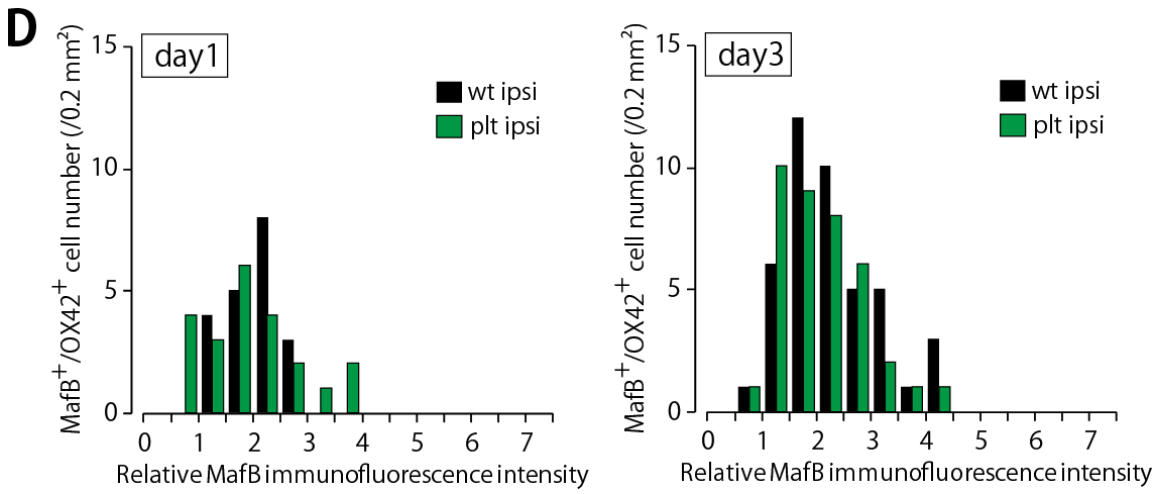


Figure 25.　plt マウスにおける末梢神経損傷後の脊髄後角ミクログリアでの MafB 発現変化
(A) wt マウスおよび plt マウスの神経損傷後 1 日目、3 日目の非損傷側および損傷側 L4 脊髄後角における MafB 免疫染色画像（Scale bar = 50 μm）。**(B, C)** wt マウスおよび plt マウスにおける神経損傷後 1 日目、3 日目の MafB/OX42 共陽性細胞数(B)と単一陽性細胞あたりの MafB 免疫蛍光強度(C)（n = 3; ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 vs Contra; #p<0.05 vs wt day3 Ipsi）。**(D)** wt マウスと plt マウスの損傷側脊髄後角内における MafB 免疫蛍光強度と陽性細胞数のヒストグラム分布。相対強度はそれぞれの非損傷側の MafB 蛍光強度平均値に対する相対値として算出した。

3. 考察

本研究では、神経障害性疼痛モデルマウスにおける転写因子 MafB の役割を解明することを目的とし、まず L4 脊髄神経損傷後の L4 脊髄における MafB 発現細胞種の特定や経時的な発現量変化を解析した。また、MafB を標的とする siRNA を用いたノックダウン実験による MafB の機能解析、さらに MafB 発現誘導因子の探索を *in vitro* および *in vivo* の系で行った。

3-1　神経障害性疼痛モデルにおける MafB の発現解析

まず、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄内において、転写因子 MafB の発現量が変化するかについて検討した。末梢神経損傷後の脊髄内 MafB の mRNA 発現量を定量解析したところ、神経損傷後 3 日目から損傷神経入力側の脊髄内でその有意な発現増加が見られ、それは 21 日目まで持続した。次に MafB に対する特異的抗体を用いて、タンパク質レベルでの MafB 発現を観察したところ、非損傷側に比して、損傷側脊髄後角における MafB 陽性細胞数および単一陽性細胞あたりの MafB タンパク質発現量が顕著な増加を示した。このように、神経損傷側脊髄特異的に MafB 発現が増加することから、MafB が神経障害性疼痛の病態に何らかの役割を有することが示唆された。また、mRNA 発現タイムコースは、これまでに我々のグループが報告してきている、神経障害性疼痛における脊髄内での活性化ミクログリアの出現タイムコースと相関しているため、ミクログリアにおいて MafB が高発現する可能性が考えられた(Inoue and Tsuda, 2009)。実際に細胞マーカーを用いた免疫組織二重染色によって、脊髄後角における MafB 発現細胞種はミクログリアに特異的であり、他の中枢神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは MafB を発現しないことを見出した。したがって，本研究が脊髄ミクログリアにおける MafB の特異的発現を明らかにした初めての報告である。

神経損傷後に観察される MafB 発現増加の特徴は、その陽性ミクログリア細胞数が細胞増殖に先立って早期に増加すること、単一陽性細胞あたりの MafB タンパク質発現量が核内で顕著に増加すること、mRNA レベルでの発現増加に先行してタンパク質レベルでの発現増加が生じることである。これまでの研究報告から脊髄後角のミクログリアは末梢神経損傷後 2 日目から顕著な細胞増殖活性を示すことが知られているが(Echeverry et al., 2008; Suter et al., 2009; Tsuda et al., 2011)、本研究結果ではそれに先立つ損傷後 1 日目から MafB 陽性細胞数が増加しており、神経損傷後早期の MafB 陽性細胞数の増加は細胞増殖によってミクログリアそのものの細胞数が増えたことによるものではないと考えられる。また、近年では末梢神経損傷後、血液脊髄関門（BSCB）の破綻により、末梢由来の単球・マクロファージや T 細胞が脊髄内に浸潤する可能性が報告されている(Zhang et al., 2007; Cao and DeLeo, 2008; Costigan et al., 2009; Echeverry et al., 2011)。単球・マクロファージは MafB を発現することが報告されているため(Kelly et al., 2000; Bakri et al., 2005; Friedman, 2007)、それら末梢由来細胞の浸潤が MafB 陽性細胞数の増加につながっている可能性も考えられた。しかしながら、損傷後 1 日目では Iba1 陽性の細胞数増加がみられていないことから、その時点で末梢由来の単球・マクロファ

ージの浸潤は起きておらず、神経損傷後早期の MafB 陽性細胞数の増加は、脊髄に常在するミクログリアにおいて MafB 発現が増加したことによるものと考えられる。また、核を染色する DAPI との三重染色により、MafB の発現増加は核内で限局的に起きていることが観察された。さらに、このような MafB タンパク質の発現増加は mRNA の発現増加に先行して生じていた。つまり、通常時の脊髄内では発現レベルが低い MafB タンパク質が、神経損傷後早期にミクログリア核内で発現増加し、その後遅れて mRNA の発現が増加するという結果になる。培養細胞での MafB 過剰発現系を用いた実験では、mRNA 発現増加に比してタンパク質レベルでの発現増加が捉えられなかったという結果が得られた（data not shown）。これらのことから、ミクログリアの MafB は通常、mRNA レベルとタンパク質レベルの両方で負の発現制御を受けている可能性、あるいは mRNA からの翻訳に非依存的なタンパク質発現制御系が存在する可能性が考えられた。実際に、過去の報告において、MafB タンパク質は JNK によるリン酸化依存的にユビキチン標識され、プロテアソーム分解系に誘導されることでその安定性が制御されることが明らかにされている(Tanahashi et al., 2010)。したがって、末梢神経損傷後の脊髄内では、まずユビキチン―プロテアソーム分解系のような負のタンパク質発現制御が解かれることによって先に MafB タンパク質の発現増加がもたらされると考えられる。そして、その後 MafB の mRNA 転写あるいは mRNA 安定性を亢進させるシグナルが働き、mRNA 発現ならびにタンパク質翻訳が誘導されるという可能性が考えられる。さらには、MafB タンパク質は GSK3 によるリン酸化や SUMO 修飾を受けることで、その転写活性をも二次的に制御されることが報告されているため、MafB の転写因子としての機能は高度に制御されていることが示唆される(Tillmanns et al., 2007; Eychene et al., 2008; Kanai et al., 2010)。総じて、通常時は脊髄常在性ミクログリアにおいて、その発現および活性が非常に厳密に制御されている MafB が、損傷神経由来の異常シグナルに対して、核内機能タンパク質として早期に発現増加し、その転写活性を亢進させることで、ミクログリアの根本的な性質変化を引き起こすトリガーとして働くという仮説が想定できる。転写因子 MafB の発現は骨髄前駆細胞からマクロファージへの分化に必要であることが報告されていることから、MafB が成熟マクロファージの性質を決定づけている可能性が示唆されている(Bakri et al., 2005; Tillmanns et al., 2007; Sarrazin et al., 2009)。したがって、ミクログリア核内において MafB タンパク質発現が顕著に高まることで、正常ミクログリアの性質・表現型がマクロファージ様の活性化型ミクログリアへと方向づけられている可能性が考えられる。実際に、末梢神経損傷後の MafB 陽性ミクログリアが増殖期マーカーEdU を発現するようになることや、ほぼすべての MafB 陽性ミクログリアが貪食細胞マーカーとしても用いられる活性化表面抗原 CD68 を共発現することからも、ミクログリアの表現型変化に対する MafB の関与が強く示唆される。

3-2　MafB によるミクログリアの機能制御

転写因子 MafB はマクロファージのアクチン構築に関わる複数の遺伝子発現を制御すること、発達過程の膵 α、β 細胞の機能分子発現を制御すること、成熟マウスでの膵 α 細胞でのグルカゴン遺伝子発現を制御することなどが報告されている(Artner et al., 2006; Aziz et al., 2006; Artner et al., 2007; Artner et al., 2010)。そこで、ミクログリアでの MafB の転写因子としての役割、特に遺伝子発現制御

能を解析するため、マウスのミクログリア細胞株 BV2 細胞を用いて MafB ノックダウン実験を行った。MafB を標的とする siRNA ならびに shRNA 発現レンチウイルスを通常の BV2 細胞に処置することによって、ミクログリアが発現する神経障害性疼痛関連分子群、P2X4 受容体(Tsuda et al., 2003; Coull et al., 2005; Trang et al., 2009)、P2X7 受容体(Chessell et al., 2005; Kobayashi et al., 2011)、P2Y12 受容体(Kobayashi et al., 2008; Tozaki-Saitoh et al., 2008)、TLR2 受容体(Kim et al., 2007)、TLR4 受容体(Tanga et al., 2005)、IL-1β (Samad et al., 2001; Honore et al., 2006; Binshtok et al., 2008; Kawasaki et al., 2008b)、IL-6 (Arruda et al., 1998; Arruda et al., 2000; Lee et al., 2010)、TNF-α (Svensson et al., 2005)などの mRNA 発現が広範に抑制されるという結果が得られた。また、ミクログリアの炎症刺激応答性遺伝子発現変化における MafB の役割を調べるため、MafB 標的 siRNA を導入した BV2 細胞に対して炎症刺激として汎用される LPS 処置を行った。通常 LPS は炎症性サイトカイン IL-1β、IL-6 および TNF-α の発現を著しく増加させるが、siRNA 導入細胞では、それらのうち IL-1β と IL-6 の発現増加が抑制された。このような MafB ノックダウンによる炎症応答の減弱は、LPS の受容体である Toll-like receptor 4（TLR4）の発現抑制によって LPS 感受性が低下していることに起因すると考えられるが、TNF-α の発現増加が抑制されなかったことから、同じ炎症性サイトカインにおいても MafB による発現制御あるいは LPS に対する応答反応に異なるメカニズムが存在することが示唆された。LPS-TLR4 シグナルの下流には、AP-1（Activator protein 1）、NF-κB（Nuclear factor-kappa B）、IRF3 などの転写因子や、MyD88（Myeloid differentiation protein-88）、IRAK（IL-1 receptor-associated kinase）、TRAF（Tumor necrosis factor receptor-associated factor）、MAPK（Mitogen-activated protein kinase）などのシグナル伝達分子が存在するため(Fujihara et al., 2003; Lu et al., 2008) 、MafB がそれら下流シグナル分子の発現制御や機能制御を行っている可能性もあり、MafB の標的遺伝子に関するより詳細な検討が必要とされる。以上の結果から、通常状態と病態に関わる炎症状態においては異なる遺伝子発現制御機構が働いていることが推察されるが、ミクログリアの MafB が疼痛に関連する受容体群ならびに炎症性サイトカインの発現を直接的あるいは間接的に制御しているということが初めて示された。

MafB は過去に、抗アポトーシス性作用を有することや、細胞周期関連分子の cyclin D2 を標的遺伝子としていることが報告された(Bergsagel and Kuehl, 2005; Machiya et al., 2007; Eychene et al., 2008; van Stralen et al., 2009)。このことは、BV2 細胞における MafB ノックダウンが cyclin D2 の発現を抑制するという本研究結果とも一致する。一方、MafB と別の Maf ファミリーである c-Maf を同時に欠損することで、マクロファージが M-CSF 応答性の無限増殖能を獲得するという報告がある(Aziz et al., 2009)。つまり、細胞増殖に関して MafB はその細胞種や細胞環境によって、二面性を有するように考えられる。神経障害性疼痛では脊髄ミクログリアが細胞増殖を起こすことが報告されている(Beggs and Salter, 2007; Echeverry et al., 2008; Suter et al., 2009; Tsuda et al., 2011)。また、本研究結果より、末梢神経損傷後の脊髄ミクログリアの MafB 陽性化が増殖期マーカーの発現に先立って生じること、神経損傷後早期の増殖性細胞の約 8 割が MafB 共陽性であることが明らかとなっている。そこで、BV2 細胞を用いて MafB のミクログリアにおける増殖制御能について解析した。MafB 標的 siRNA 導入 BV2 細胞および MafB 標的 shRNA 安定発現 BV2 細胞では、元来 BV2 細胞が有する高い増殖能が部分的に抑制された。これらのことから、ミクログリアに発現する MafB は、細胞周期の開始に関わる cyclin D2 の遺伝子発現制御等を介して、その細胞増殖能あるいは生存性に関与するこ

とが示唆された。

一般的に、転写因子は複雑な相互作用を介して、より精密に遺伝子発現制御を行うことが知られており、MafB に関しても他の転写因子 PU.1（Sfpi1, SFFV proviral integration 1）、Fos（FBJ osteosarcoma oncogene）、Myb（Myeloblastosis oncogene）、Gcm2（Glial cells missing homolog 2）あるいは TFE3（Transcription factor E3）などとヘテロダイマーを形成すること、DNA 結合における競合性を有すること、相互に発現制御することが報告されている(Kataoka et al., 1994; Sieweke et al., 1996; Bakri et al., 2005; Tillmanns et al., 2007; Zanocco-Marani et al., 2009; Kamitani-Kawamoto et al., 2011)。最近では MafB と IRF ファミリーとの相互作用を詳細に研究した報告がなされた(Kim and Seed, 2010)。その報告内容は、MafB が DNA への直接的な結合とは別に IRF3 および IRF7 に直接結合することにより、CBP（CREB binding protein）との複合体形成阻害や DNA 結合阻害などを介して、それら IRF の転写活性を制御するというものである。近年、我々のグループによって、ミクログリアの過活動状態および疼痛発現の制御に重要な役割を担う転写因子として IRF8 および IRF5 が同定されている（増田隆博博士論文 2011、吉永遼平修士論文 2012）。本研究結果においても、MafB のノックダウンによって IRF8 および IRF5 の遺伝子発現が抑制されることが明らかとなっている。さらに、IRF8 欠損マウスでは末梢神経損傷後の脊髄内 MafB 遺伝子発現量およびタンパク質発現量が抑制傾向にあること、BV2 細胞では MafB タンパク質と IRF5 タンパク質が結合していることなどの予備実験結果を得ている（data not shown）。すなわち、IRF8 や IRF5 に対して MafB が何らかの相互作用を働きかけることで、複雑なミクログリアの細胞応答を決定している可能性が十分に考えられ、そのような転写因子間相互作用に関するより詳細な検討が今後の研究の課題である。

3-3　アロディニア行動に対する MafB の寄与

MafB に関して、神経障害性疼痛モデルの脊髄内においてミクログリア特異的に発現増加すること、培養細胞系において疼痛関連遺伝子群の発現を制御すること、ミクログリアおよび疼痛発現の重要制御因子 IRF8、IRF5 との相互作用があることなどが示されたが、実際に末梢神経障害後のアロディニア行動に MafB が寄与するかという点について検討した。MafB 欠損マウスは致死的であるため(Aziz et al., 2006; Eychene et al., 2008)、本検討では siRNA をマウスの脊髄くも膜下腔内へ投与する手法を用いた。神経損傷後早期に増加する MafB の発現を抑制するため、siRNA の投与は神経損傷の 3 日前から行い、そのノックダウン効果は、神経損傷後 3 日目の脊髄後角ミクログリアでの MafB タンパク質発現レベルが有意に低下したことにより確認した。このような siRNA 投与マウスでは、神経損傷後のアロディニア行動が部分的ながら有意に抑制された。MafB ノックダウン効率が完全でない可能性、MafB 非依存的な経路が存在する可能性も残されるが、脊髄ミクログリアの MafB がアロディニア発現に対して少なからず寄与しているということが明らかとなった。また、この siRNA 投与マウスでは神経損傷後 3 日目の脊髄内における疼痛関連遺伝子群の発現が、特に ATP 受容体および Toll-like receptor 2 において顕著に抑制されていることから、MafB は少なくとも直接的あるいは間接的な疼痛関連遺伝子の発現制御を介してアロディニア発症に寄与していると考えられる。一方、神経損傷後 7 日目から siRNA を投与したマウスでは後肢逃避閾値の回復が見られなかったことから、

MafB は一旦発症したアロディニア行動に対する寄与は少なく、アロディニアの形成期において重要な役割を担っているいうことが推察される。すなわち、これらの結果は末梢神経損傷後早期に見られるミクログリアの初期活性化段階において、MafB の発現が通常ミクログリアから活性化型ミクログリアへとシフトする際の引き金になり得るという前述の仮説を支持するものである。

前述の通り、末梢神経損傷後の脊髄後角 MafB 陽性ミクログリアが増殖期マーカーを共発現することや、BV2 細胞の増殖能が MafB ノックダウンによって抑制されるという本研究結果から、MafB がミクログリアの細胞増殖能を制御している可能性が示唆されている。そこで、siRNA 投与マウスを用いて、神経損傷後の脊髄ミクログリアの細胞増殖に対する MafB の関与について検討した。その結果、通常観察される神経損傷後 3 日目の脊髄後角ミクログリアの細胞増殖は、siRNA 投与マウスで有意に抑制されなかった。神経損傷後 48 時間における EdU 陽性細胞数も、コントロールに対して有意差が認められなかった（data not shown）。また、MafB はマクロファージにおいて細胞骨格を制御する遺伝子の発現応答に関与することが報告されている(Aziz et al., 2006)。そこで、siRNA 投与マウスでの神経損傷後の脊髄ミクログリアの細胞形態を観察したが、細胞体の肥大化ならびに突起の短縮といった活性化型ミクログリアに特徴的に見られる形態学的変化に劇的な違いは見られなかった。以上のことから、末梢神経損傷後に観察されるミクログリアの細胞増殖や形態変化が、MafB によって制御されるか否かについては未だ議論の余地があり、それを結論付けるためのさらなる検討が必要とされる。

3-4　末梢神経損傷によるミクログリアでの MafB 発現誘導

これまでの結果より、MafB は末梢神経損傷後早期に脊髄ミクログリア内で発現増加し、おそらくその転写活性を亢進させることで、ミクログリアの表現型変化ならびに疼痛関連遺伝子の発現制御を介してアロディニア症状に寄与することが明らかとなった。そこで、神経損傷後に脊髄ミクログリアで MafB の発現が誘導されるメカニズムの解明を試みた。過去の報告において、神経損傷後の痛覚伝達に ATP が関わることや(Nakatsuka and Gu, 2001; Cook and McCleskey, 2002; Inoue et al., 2005)、神経損傷により脊髄ミクログリア特異的に P2X4 受容体が発現増加し、その欠損マウスではアロディニアが完全に抑制されること(Tsuda et al., 2003; Tsuda et al., 2009b)などが示されている。そこで、ATP-P2X4 受容体シグナルが神経損傷後のミクログリアでの MafB 発現誘導に関与する可能性を考え、P2X4 受容体欠損マウスを用いて MafB 発現解析を行った。免疫組織染色の結果、P2X4 受容体欠損マウスにおける末梢神経損傷後の脊髄内 MafB タンパク質の発現は、野生型マウスと同程度であった。すなわち、P2X4 受容体を介したシグナルは MafB 発現誘導には関与しないことが示唆された。このことは P2X4 受容体の発現レベルが正常ミクログリアでは非常に低く、神経損傷後 3 日目から顕著に発現増加することとも一致する(Tsuda et al., 2003)。本研究結果から、MafB ノックダウンにより P2X4 受容体遺伝子の発現が抑制されたため、神経損傷後に MafB の発現が先行して生じ、その遺伝子発現制御下に P2X4 受容体発現が位置する可能性が考えられる。

次に、近年神経障害性疼痛との関連が報告された CC ケモカインリガンドのひとつ、CCL21 に着目した(Biber et al., 2011)。その報告では、CCL21 が末梢神経損傷 12 時間後という早期に後根神経節

（DRG）で発現増加し、その後、脊髄後角に輸送されてミクログリアに作用することで、P2X4 受容体の発現を介したアロディニア形成に関与することが示されている。CCL21 の単独脊髄腔内投与では慢性アロディニアは発症しないが、CCL21 の発現が欠損している *plt* マウス(Mori et al., 2001; Nakano and Gunn, 2001; Rappert et al., 2002)では神経損傷後のアロディニア発症が完全に抑制されること、神経損傷した *plt* マウスに CCL21 を単回脊髄腔内投与することで持続的なアロディニア形成が再現されることなどから、CCL21 はアロディニア発症に十分ではないが、必要な因子であるということが示唆される。そこで、CCL21 がミクログリアでの MafB 発現誘導因子になる可能性を考えた。CCL21 を初代培養ミクログリアに処置した場合、および CCL21 をマウス脊髄腔内に単回投与した場合のミクログリアでの MafB タンパク質発現変化を検討したところ、いずれも一過性の有意な発現増加を示した。さらに、*plt* マウスを用いて末梢神経損傷後の脊髄内 MafB タンパク質の発現を免疫組織染色により解析したところ、野生型マウスに見られる MafB 陽性細胞数およびタンパク質発現増加に対して抑制傾向が見られた。したがって、損傷を受けた一次求心性神経由来の CCL21 が、脊髄ミクログリアに作用して MafB の発現を誘導する役割を少なからず有することが示唆されるが、CCL21 欠損マウスで MafB 発現が完全には抑制されなかったことから、CCL21 非依存的な MafB 発現誘導メカニズムが存在することが考えられる。過去の報告と併せて要約すると、CCL21 を欠損する *plt* マウスでは神経損傷後にアロディニアが形成されない一方、ミクログリアにおける MafB の発現誘導、細胞増殖、形態的活性化は影響されずに生じ、そのような状態下、CCL21 を脊髄腔内に単回投与するだけで持続的なアロディニアが再現される。しかしながら神経の損傷が無い場合では CCL21 の投与だけでは持続的なアロディニアは形成されない。つまり、ミクログリアにおける MafB の発現の陽性化や細胞増殖のみでは疼痛形成には不十分であり、これらは CCL21 とは独立したシグナルにより制御されている。ここでは MafB 陽性化によりミクログリアの活性化へのプライミングが行われている可能性があり、そこに CCL21 刺激という引き金が入ることで、MafB 発現増強や炎症的表現型への移行が惹起され、P2X4 受容体等のより疼痛関連性遺伝子を高発現する活性化型ミクログリアになるという仮説が考えられる。

以上のことから、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、CCL21 を含む損傷神経由来因子によって非常に早い段階で脊髄後角の正常ミクログリア内で MafB 発現が増加し、その MafB がミクログリアの質的変化の契機となり、様々な疼痛関連遺伝子群の発現制御を介してアロディニア症状に関与していることが明らかとなった。今後は MafB ヘテロノックアウトマウスやノックアウト細胞等を用いて、神経障害性疼痛におけるより詳細な MafB の機能解析、MafB 発現誘導メカニズム、ミクログリアの炎症性・抗炎症性表現型制御メカニズム、細胞増殖との関連性、他の転写因子との相互作用ならびに標的遺伝子発現制御メカニズム等を解明していく必要性がある。

総括

本研究では、マクロファージの分化に関わる因子としてよく知られる転写因子 MafB が、末梢神経損傷後に脊髄ミクログリアが活性化型へとシフトする際の引き金になる可能性、すなわち活性化型ミクログリアの性質を特徴づける可能性を探求し、そのミクログリアでの役割ならびに神経障害性疼痛への寄与を解明することを目的とした。

転写因子 MafB の発現は、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄内において、mRNA レベルでは末梢神経損傷後 3 日目から 21 日目まで、タンパク質レベルでは 1 日目から少なくとも 7 日目までの増加が確認された。また、脊髄後角内の MafB 発現はミクログリアに特異的であり、神経損傷後早期の MafB タンパク質の発現増加は、細胞増殖や末梢骨髄系細胞の浸潤等に依存するものではなく、常在性のミクログリアで生じることが見出された。この神経損傷後の脊髄後角内 MafB 陽性ミクログリアでは、細胞周期の活性化や活性化表面抗原の発現といった表現型変化を呈することが認められ、MafB の転写活性の亢進がミクログリアの質的変化を引き起こす可能性が示唆された。

そこで、MafB の転写因子としての役割を明らかにするため、ミクログリアにおける遺伝子発現制御機能を解析した。培養ミクログリア細胞において、通常状態の MafB 発現を siRNA および shRNA 発現レンチウイルスを用いてノックダウンした系では、疼痛に関連する遺伝子群（ATP 受容体、Toll 様受容体、炎症性サイトカイン、カテプシン S、IRF 転写因子等）の発現が広範に抑制された。炎症刺激下の炎症応答性サイトカインの発現も、MafB ノックダウンにより抑制された。これらのことから、MafB は通常状態および炎症状態において、ミクログリアの機能分子の発現制御を担っていることが示された。また、通常高い増殖能を有する培養ミクログリア細胞が、MafB のノックダウンによってその増殖活性あるいは生存性を低下させることが示された。以上の結果から、末梢神経損傷後早期に発現する MafB が、活性化ミクログリアにおける機能分子の発現亢進や細胞増殖に寄与している可能性が示唆された。

次に、神経障害性疼痛モデルマウスにおける MafB の役割を明らかにするため、マウスの脊髄腔内に siRNA を投与することによって *in vivo* での MafB のノックダウンモデルを作製した。siRNA を前投与したマウスでは、末梢神経損傷後のミクログリアにおける MafB タンパク質の発現が有意に抑制されることが確認され、軽度機械刺激に対する後肢逃避閾値の低下も部分的に改善された。すなわち、神経損傷後にミクログリアで発現する MafB が、アロディニア症状に寄与する働きを有することが示唆された。実際にそのような siRNA 投与マウスにおいて、神経損傷後の各種疼痛関連遺伝子群の mRNA 発現レベルを解析した結果、*in vitro* での検討と同様に、広範な遺伝子発現の抑制が確認され、特に ATP 受容体および Toll-like receptor2 が顕著な発現低下を示した。一方、アロディニアが形成されてからの siRNA 投与ではアロディニア行動に回復効果が見られなかったため、アロディニアの形成期、すなわちミクログリアの初期活性化段階において、MafB が疼痛に関わる役割を担っていることが示唆された。また、神経損傷後のミクログリアの細胞増殖および形態変化には、siRNA 前投与による MafB ノックダウンの影響が見られなかった。すなわち、転写因子 MafB は末梢神経損傷後早期にミクログリアで発現増加することで、少なくとも疼痛に関わる数種の遺伝子発現制御を介してアロディニア症状に関与することが考えられる。

神経損傷後に脊髄ミクログリアでの MafB の発現を誘導する因子として、近年損傷神経由来因子として重要な役割を担うことが報告された CCL21 ケモカインについて解析した。CCL21 を培養ミクログリア細胞に処置することで、MafB タンパク質の発現が一過性に増加した。同様に、CCL21 をマウス脊髄腔内に単回投与することで、脊髄ミクログリアにおける MafB タンパク質の発現が増加した。CCL21 を欠損する plt マウスでは、神経損傷後の MafB 発現に抑制傾向が見られた。したがって、損傷を受けた一次求心性神経由来の CCL21 が、脊髄ミクログリアに作用して MafB の発現を誘導することが示唆された。

以上、本研究結果により、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、CCL21 を含む損傷神経由来因子によって非常に早い段階で脊髄後角の正常ミクログリア内で MafB 発現が増加し、その MafB が活性化型ミクログリアへとシフトするミクログリアの質的変化の契機となり、直接的あるいは間接的な疼痛関連遺伝子群の発現制御を介してアロディニア症状に関与していることが明らかとなった（Figure 26）。ミクログリアでの MafB の発現および遺伝子制御能、神経障害性疼痛への寄与を報告したのは本研究が初めてであるため、ここで明らかにされた結果が、今後の神経障害性疼痛発症メカニズムの解明ならびに、他のミクログリアが関わる中枢神経系疾患の病態解明に向けた研究に貢献することが期待される。

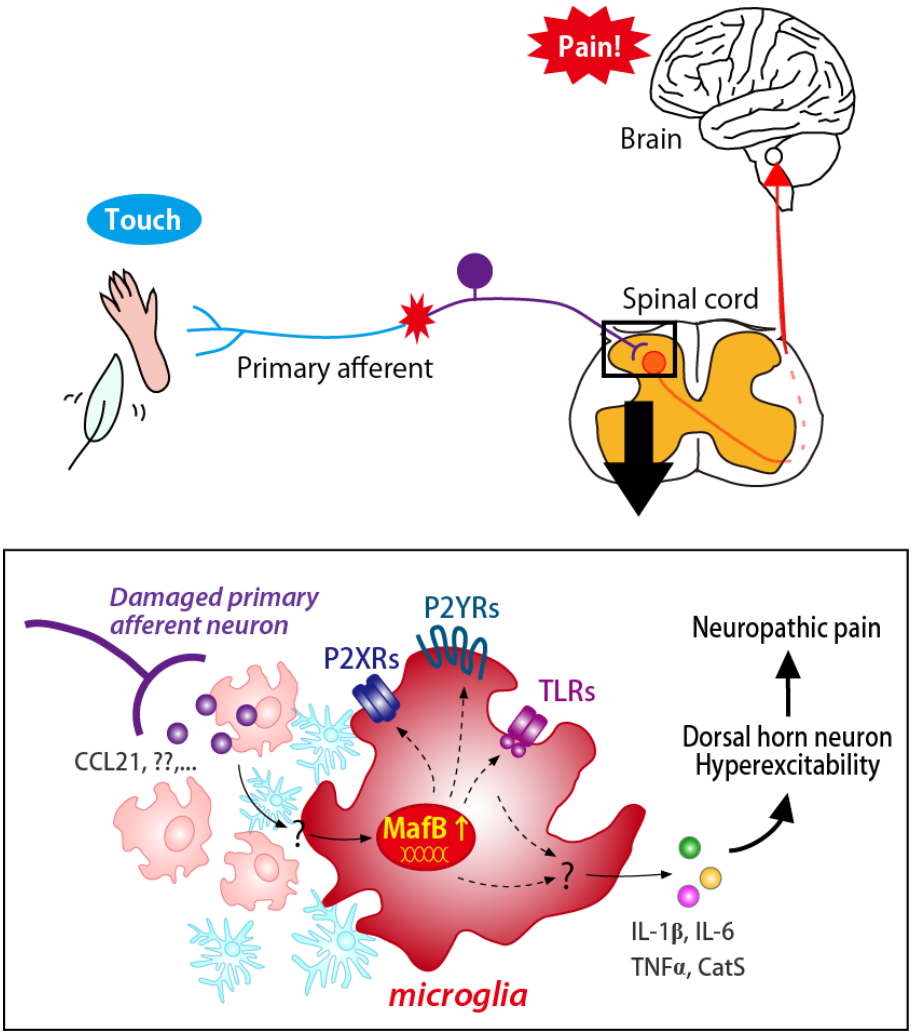


Figure 26.　脊髄ミクログリアに発現する MafB と神経障害性疼痛発症メカニズムの模式図

尚、本論文の内容は以下のように公表した。

【論文発表】

「MafB triggers functional changes of spinal microglia that contributes to allodynia following peripheral nerve injury」（投稿準備中）

【学会発表】

「Transcriptional factor MafB regulates microglial proliferation and gene expression」

Junya Masuda, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Sosuke Yoneda, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue

学会：Neuroscience 2011（ポスター発表）

場所：ワシントンコンベンションセンター（米国、ワシントン）

日時：2011 年 11 月 12 日～16 日

「神経障害性疼痛モデルにおいて脊髄ミクログリア特異的に発現する転写因子 MafB の役割」

増田　潤哉、齊藤　秀俊、米田　聡介、津田　誠、井上　和秀

学会：第 64 回日本薬理学会西南部会（口頭発表）

場所：KKR ホテル博多（福岡県福岡市）

日時：2011 年 11 月 20 日

「末梢神経障害後早期に脊髄後角ミクログリアに特異的に発現する新規転写因子の役割」

増田　潤哉、齊藤　秀俊、米田　聡介、津田　誠、井上　和秀

学会：生理学研究所痛みの研究会～痛みの病態生理と神経・分子機構～（口頭発表）

場所：岡崎カンファレンスセンター（愛知県岡崎市）

日時：2011 年 12 月 21 日、22 日

「転写因子 MafB によるミクログリアの機能制御と神経障害性疼痛への関与」

増田　潤哉、齊藤　秀俊、米田　聡介、津田　誠、井上　和秀

学会：第 8 回九大痛みの研究会（口頭発表）

場所：九州大学医学部百年講堂（福岡県福岡市）

日時：2012 年 2 月 2 日

また、博士課程在学中に本論文以外の研究内容で以下の発表を行った。

【論文発表】

「Intrathecal delivery of PDGF produces tactile allodynia through its receptors in spinal microglia」
Junya Masuda*, Makoto Tsuda*, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue
Molecular Pain 2009, 5:23
*These authors contributed equally to this work

【学会発表】

「血小板由来増殖因子 PDGF 誘発アロディニアにおける脊髄ミクログリアの関与」
増田　潤哉、津田　誠、齊藤　秀俊、井上　和秀
学会：第 52 回日本神経化学会大会（口頭発表）
場所：ホテル天坊（群馬県渋川市）
日時：2009 年 6 月 21 日～24 日

「Spinal microglia mediate PDGF-induced tactile allodynia in rats」
Junya Masuda, Makoto Tsuda, Hidetoshi Saitoh, Kazuhide Inoue
学会：Fukuoka Purine 2009（ポスター発表、ポスターアワード受賞）
場所：ザ・ルイガンス福岡（福岡県福岡市）
日時：2009 年 7 月 23 日～25 日

「Analysis of microglial activation in tissue slice using two-photon imaging」
Junya Masuda, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue
学会：Purines 2010（口頭およびポスター発表）
場所：PALAU FIRAL I DE CONGRESSOS DE TARRAGONA（スペイン、タラゴナ）
日時：2010 年 5 月 30 日～6 月 2 日

「Real time imaging analysis of microglial condition in acute brain slice」
Junya Masuda, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue
学会：Neuro2010（ポスター発表）
場所：神戸コンベンションセンター（兵庫県神戸市）
日時：2010 年 9 月 2 日～4 日

「神経障害性疼痛モデルマウスにおける活性化型脊髄ミクログリアは高い遊走能を有する」
増田　潤哉、齊藤　秀俊、津田　誠、井上　和秀
学会：第 84 回日本薬理学会年会（ポスター発表）
場所：パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
日時：2011 年 3 月 22 日～24 日

引用文献

Abbadie C (2005) Chemokines, chemokine receptors and pain. Trends Immunol 26:529-534.

Abbadie C, Bhangoo S, De Koninck Y, Malcangio M, Melik-Parsadaniantz S, White FA (2009) Chemokines and pain mechanisms. Brain Res Rev 60:125-134.

Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. Nature 457:675-677.

Arruda JL, Sweitzer S, Rutkowski MD, DeLeo JA (2000) Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. Brain Res 879:216-225.

Arruda JL, Colburn RW, Rickman AJ, Rutkowski MD, DeLeo JA (1998) Increase of interleukin-6 mRNA in the spinal cord following peripheral nerve injury in the rat: potential role of IL-6 in neuropathic pain. Brain Res Mol Brain Res 62:228-235.

Artner I, Le Lay J, Hang Y, Elghazi L, Schisler JC, Henderson E, Sosa-Pineda B, Stein R (2006) MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. Diabetes 55:297-304.

Artner I, Blanchi B, Raum JC, Guo M, Kaneko T, Cordes S, Sieweke M, Stein R (2007) MafB is required for islet beta cell maturation. Proc Natl Acad Sci U S A 104:3853-3858.

Artner I, Hang Y, Mazur M, Yamamoto T, Guo M, Lindner J, Magnuson MA, Stein R (2010) MafA and MafB regulate genes critical to beta-cells in a unique temporal manner. Diabetes 59:2530-2539.

Aziz A, Soucie E, Sarrazin S, Sieweke MH (2009) MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. Science 326:867-871.

Aziz A, Vanhille L, Mohideen P, Kelly LM, Otto C, Bakri Y, Mossadegh N, Sarrazin S, Sieweke MH (2006) Development of macrophages with altered actin organization in the absence of MafB. Mol Cell Biol 26:6808-6818.

Bakri Y, Sarrazin S, Mayer UP, Tillmanns S, Nerlov C, Boned A, Sieweke MH (2005) Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. Blood 105:2707-2716.

Baron R (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. Nat Clin Pract Neurol 2:95-106.

Basbaum AI, Fields HL (1979) The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. J Comp Neurol 187:513-531.

Beggs S, Salter MW (2007) Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. Brain Behav Immun 21:624-633.

Bergsagel PL, Kuehl WM (2005) Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. J Clin Oncol 23:6333-6338.

Biber K, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Tsukamoto K, Toyomitsu E, Masuda T, Boddeke H, Inoue K (2011) Neuronal CCL21 up-regulates microglia P2X4 expression and initiates neuropathic pain development.

EMBO J 30:1864-1873.

Binshtok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Vardeh D, Shi L, Brenner GJ, Ji RR, Bean BP, Woolf CJ, Samad TA (2008) Nociceptors are interleukin-1beta sensors. J Neurosci 28:14062-14073.

Cao L, DeLeo JA (2008) CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. Eur J Immunol 38:448-458.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods 53:55-63.

Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. Pain 114:386-396.

Clark AK, Yip PK, Malcangio M (2009) The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S. J Neurosci 29:6945-6954.

Clark AK, Yip PK, Grist J, Gentry C, Staniland AA, Marchand F, Dehvari M, Wotherspoon G, Winter J, Ullah J, Bevan S, Malcangio M (2007) Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. Proc Natl Acad Sci U S A 104:10655-10660.

Cook SP, McCleskey EW (2002) Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. Pain 95:41-47.

Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, Barrett L, Brenner GJ, Vardeh D, Woolf CJ, Fitzgerald M (2009) T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. J Neurosci 29:14415-14422.

Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. Nature 424:938-942.

Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. Nature 438:1017-1021.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci 8:752-758.

Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. Annu Rev Pharmacol Toxicol 20:441-462.

Echeverry S, Shi XQ, Zhang J (2008) Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. Pain 135:37-47.

Echeverry S, Shi XQ, Rivest S, Zhang J (2011) Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. J Neurosci 31:10819-10828.

Eychene A, Rocques N, Pouponnot C (2008) A new MAFia in cancer. Nat Rev Cancer 8:683-693.

Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. Science 298:556-562.

Friedman AD (2007) Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. Oncogene 26:6816-6828.

Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. Pharmacol Ther 100:171-194.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science 330:841-845.

Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. Nat Neurosci 8:1078-1086.

Hang Y, Stein R (2011) MafA and MafB activity in pancreatic beta cells. Trends Endocrinol Metab 22:364-373.

Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. Glia 40:140-155.

Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci 10:1387-1394.

Hansson E, Ronnback L (2003) Glial neuronal signaling in the central nervous system. FASEB J 17:341-348.

Hashizume H, DeLeo JA, Colburn RW, Weinstein JN (2000) Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat. Spine 25:1206-1217.

Honore P, Wade CL, Zhong C, Harris RR, Wu C, Ghayur T, Iwakura Y, Decker MW, Faltynek C, Sullivan J, Jarvis MF (2006) Interleukin-1alphabeta gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. Behav Brain Res 167:355-364.

Inoue K (2006) The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. Pharmacol Ther 109:210-226.

Inoue K (2008) Purinergic systems in microglia. Cell Mol Life Sci 65:3074-3080.

Inoue K, Tsuda M (2009) Microglia and neuropathic pain. Glia 57:1469-1479.

Inoue K, Tsuda M, Koizumi S (2005) ATP receptors in pain sensation: Involvement of spinal microglia and P2X(4) receptors. Purinergic Signal 1:95-100.

Inoue K, Koizumi S, Tsuda M (2007) The role of nucleotides in the neuron--glia communication responsible for the brain functions. J Neurochem 102:1447-1458.

Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP (2005) Microglia and multiple sclerosis. J Neurosci Res 81:363-373.

Kamitani-Kawamoto A, Hamada M, Moriguchi T, Miyai M, Saji F, Hatamura I, Nishikawa K, Takayanagi H, Hitoshi S, Ikenaka K, Hosoya T, Hotta Y, Takahashi S, Kataoka K (2011) MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development. J Bone Miner Res 26:2463-2472.

Kanai K, Reza HM, Kamitani A, Hamazaki Y, Han SI, Yasuda K, Kataoka K (2010) SUMOylation negatively regulates transcriptional and oncogenic activities of MafA. Genes Cells 15:971-982.

Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, Inoue K (2009) Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT. J Neurochem 108:115-125.

Kataoka K (2007) Multiple mechanisms and functions of maf transcription factors in the regulation of

tissue-specific genes. J Biochem 141:775-781.

Kataoka K, Fujiwara KT, Noda M, Nishizawa M (1994) MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun. Mol Cell Biol 14:7581-7591.

Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR (2008a) Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. J Neurosci 28:5189-5194.

Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, Park JY, Zhuang ZY, Tan PH, Gao YJ, Roy K, Corfas G, Lo EH, Ji RR (2008b) Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. Nat Med 14:331-336.

Kelly LM, Englmeier U, Lafon I, Sieweke MH, Graf T (2000) MafB is an inducer of monocytic differentiation. EMBO J 19:1987-1997.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. Physiol Rev 91:461-553.

Kim D, Kim MA, Cho IH, Kim MS, Lee S, Jo EK, Choi SY, Park K, Kim JS, Akira S, Na HS, Oh SB, Lee SJ (2007) A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. J Biol Chem 282:14975-14983.

Kim H, Seed B (2010) The transcription factor MafB antagonizes antiviral responses by blocking recruitment of coactivators to the transcription factor IRF3. Nat Immunol 11:743-750.

Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain 50:355-363.

Kobayashi K, Takahashi E, Miyagawa Y, Yamanaka H, Noguchi K (2011) Induction of the P2X7 receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. Neurosci Lett 504:57-61.

Kobayashi K, Yamanaka H, Fukuoka T, Dai Y, Obata K, Noguchi K (2008) P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. J Neurosci 28:2892-2902.

Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Inoue K (2003) Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. Proc Natl Acad Sci U S A 100:11023-11028.

Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K (2007) UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. Nature 446:1091-1095.

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19:312-318.

Kuner R (2010) Central mechanisms of pathological pain. Nat Med 16:1258-1266.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience 39:151-170.

Le W, Rowe D, Xie W, Ortiz I, He Y, Appel SH (2001) Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. J Neurosci 21:8447-8455.

Lee KM, Jeon SM, Cho HJ (2010) Interleukin-6 induces microglial CX3CR1 expression in the spinal cord after peripheral nerve injury through the activation of p38 MAPK. Eur J Pain 14:682 e681-612.

Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. Nat Med 5:1403-1409.

Liu H, Mantyh PW, Basbaum AI (1997) NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. Nature 386:721-724.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine 42:145-151.

Machiya J, Shibata Y, Yamauchi K, Hirama N, Wada T, Inoue S, Abe S, Takabatake N, Sata M, Kubota I (2007) Enhanced expression of MafB inhibits macrophage apoptosis induced by cigarette smoke exposure. Am J Respir Cell Mol Biol 36:418-426.

Maguire-Zeiss KA, Federoff HJ (2010) Future directions for immune modulation in neurodegenerative disorders: focus on Parkinson's disease. J Neural Transm 117:1019-1025.

McMahon SB, Malcangio M (2009) Current challenges in glia-pain biology. Neuron 64:46-54.

Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. Science 150:971-979.

Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. Nat Rev Neurosci 10:23-36.

Monsonego A, Weiner HL (2003) Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. Science 302:834-838.

Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. J Neurosci 22:6724-6731.

Mori S, Nakano H, Aritomi K, Wang CR, Gunn MD, Kakiuchi T (2001) Mice lacking expression of the chemokines CCL21-ser and CCL19 (plt mice) demonstrate delayed but enhanced T cell immune responses. J Exp Med 193:207-218.

Nakajima K, Kohsaka S (2001) Microglia: activation and their significance in the central nervous system. J Biochem 130:169-175.

Nakano H, Gunn MD (2001) Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. J Immunol 166:361-369.

Nakatsuka T, Gu JG (2001) ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. J Neurosci 21:6522-6531.

Napoli I, Neumann H (2010) Protective effects of microglia in multiple sclerosis. Exp Neurol 225:24-28.

Narita M, Yoshida T, Nakajima M, Miyatake M, Takagi T, Yajima Y, Suzuki T (2006) Direct evidence for spinal cord microglia in the development of a neuropathic pain-like state in mice. J Neurochem 97:1337-1348.

Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honore P, Luger NM, Finke MP, Li J, Lappi DA, Simone DA, Mantyh PW (1999) Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. Science 286:1558-1561.

Nicholson B (2006) Differential diagnosis: nociceptive and neuropathic pain. Am J Manag Care 12:S256-262.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308:1314-1318.

Nishizawa M, Kataoka K, Goto N, Fujiwara KT, Kawai S (1989) v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. Proc Natl Acad Sci U S A 86:7711-7715.

Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. Neuron 17:553-565.

Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. Trends Neurosci 30:527-535.

Raivich G (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. Trends Neurosci 28:571-573.

Ransohoff RM, Cardona AE (2010) The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. Nature 468:253-262.

Rappert A, Biber K, Nolte C, Lipp M, Schubel A, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Boddeke HW, Kettenmann H (2002) Secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21) activates CXCR3 to trigger a Cl- current and chemotaxis in murine microglia. J Immunol 168:3221-3226.

Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. Nat Rev Immunol 11:775-787.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ (2001) Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. Nature 410:471-475.

Sarrazin S, Mossadegh-Keller N, Fukao T, Aziz A, Mourcin F, Vanhille L, Kelly Modis L, Kastner P, Chan S, Duprez E, Otto C, Sieweke MH (2009) MafB restricts M-CSF-dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells. Cell 138:300-313.

Sieweke MH, Tekotte H, Frampton J, Graf T (1996) MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. Cell 85:49-60.

Steinhauser C, Gallo V (1996) News on glutamate receptors in glial cells. Trends Neurosci 19:339-345.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. Prog Neurobiol 57:563-581.

Suter MR, Berta T, Gao YJ, Decosterd I, Ji RR (2009) Large A-fiber activity is required for microglial proliferation and p38 MAPK activation in the spinal cord: different effects of resiniferatoxin and bupivacaine on spinal microglial changes after spared nerve injury. Mol Pain 5:53.

Svensson CI, Schafers M, Jones TL, Powell H, Sorkin LS (2005) Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal P-p38. Neurosci Lett 379:209-213.

Tanahashi H, Kito K, Ito T, Yoshioka K (2010) MafB protein stability is regulated by the JNK and ubiquitin-proteasome pathways. Arch Biochem Biophys 494:94-100.

Tanga FY, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA (2005) The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. Proc Natl Acad Sci U S A 102:5856-5861.

Tillmanns S, Otto C, Jaffray E, Du Roure C, Bakri Y, Vanhille L, Sarrazin S, Hay RT, Sieweke MH (2007) SUMO modification regulates MafB-driven macrophage differentiation by enabling Myb-dependent transcriptional repression. Mol Cell Biol 27:5554-5564.

Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K (2008) P2Y12 receptors in spinal

microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. J Neurosci 28:4949-4956.

Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW (2009) P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. J Neurosci 29:3518-3528.

Tsuda M, Inoue K, Salter MW (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. Trends Neurosci 28:101-107.

Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2010) Pain and purinergic signaling. Brain Res Rev 63:222-232.

Tsuda M, Masuda T, Kitano J, Shimoyama H, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2009a) IFN-gamma receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. Proc Natl Acad Sci U S A 106:8032-8037.

Tsuda M, Kuboyama K, Inoue T, Nagata K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2009b) Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays. Mol Pain 5:28.

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. Nature 424:778-783.

Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Masuda T, Toyomitsu E, Tezuka T, Yamamoto T, Inoue K (2008a) Lyn tyrosine kinase is required for P2X(4) receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury. Glia 56:50-58.

Tsuda M, Toyomitsu E, Komatsu T, Masuda T, Kunifusa E, Nasu-Tada K, Koizumi S, Yamamoto K, Ando J, Inoue K (2008b) Fibronectin/integrin system is involved in P2X(4) receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury. Glia 56:579-585.

Tsuda M, Kohro Y, Yano T, Tsujikawa T, Kitano J, Tozaki-Saitoh H, Koyanagi S, Ohdo S, Ji RR, Salter MW, Inoue K (2011) JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. Brain 134:1127-1139.

van den Pol AN, Obrietan K, Chen G (1996) Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. J Neurosci 16:4283-4292.

van Stralen E, van de Wetering M, Agnelli L, Neri A, Clevers HC, Bast BJ (2009) Identification of primary MAFB target genes in multiple myeloma. Exp Hematol 37:78-86.

Verge GM, Milligan ED, Maier SF, Watkins LR, Naeve GS, Foster AC (2004) Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. Eur J Neurosci 20:1150-1160.

Watkins LR, Maier SF (2003) Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. Nat Rev Drug Discov 2:973-985.

Woolf CJ (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. Nature 306:686-688.

Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. Lancet 353:1959-1964.

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. Nature 355:75-78.

Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S

(2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. J Neurosci 22:1763-1771.

Yaksh TL, Jessell TM, Gamse R, Mudge AW, Leeman SE (1980) Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. Nature 286:155-157.

Zanocco-Marani T, Vignudelli T, Parenti S, Gemelli C, Condorelli F, Martello A, Selmi T, Grande A, Ferrari S (2009) TFE3 transcription factor regulates the expression of MAFB during macrophage differentiation. Exp Cell Res 315:1798-1808.

Zhang F, Vadakkan KI, Kim SS, Wu LJ, Shang Y, Zhuo M (2008) Selective activation of microglia in spinal cord but not higher cortical regions following nerve injury in adult mouse. Mol Pain 4:15.

Zhang J, Shi XQ, Echeverry S, Mogil JS, De Koninck Y, Rivest S (2007) Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. J Neurosci 27:12396-12406.

Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhou Y, Hong JS, Zhang J (2005) Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. FASEB J 19:533-542.

Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, Wen YR, Huang J, Ji RR (2007) Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. Brain Behav Immun 21:642-651.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました九州大学大学院薬学研究院薬理学分野　井上　和秀　教授に謹んで感謝致します。

本研究の遂行および本論文の完成に際し、些事に渡り終始多大なる御指導、御助言と御支援を賜りました九州大学大学院薬学研究院薬理学分野　津田　誠　准教授、齊藤　秀俊　助教に心から感謝致します。

研究生活において、終始温かな御支援を賜りました九州大学大学院薬学研究院薬理学分野　末宗　ゆり子　秘書に深く感謝致します。

本研究ならびに研究生活において、多大なる御協力、有益な御助言を賜りました増田　隆博　博士、併せて、厚い御協力、御支援を賜りました米田　聡介　修士、川田　竜　学士、小嶋　ちなみ　学士に深く感謝致します。また、学生生活を豊かなものにして下さいました薬理学教室の皆様に感謝致します。

また、長きに渡る学生生活において、絶え間ない精神的、経済的援助を賜り、温かく見守って下さった家族に心から感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり、数多くの尊い命を捧げてくれた動物達に深く感謝するとともに、御冥福をお祈り致します。